

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**  
**V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A**  
**KONTROLY LÉČIV**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

Validace HPLC metody stanovení některých vitamínů  
v multivitaminovém přípravku.

Validation of HPLC method for determination of some  
vitamins in a multivitamin product.

Hradec Králové 2010

Kristýna Stehlíková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Milanu Mokrému, CSc. za jeho odborné vedení, řadu cenných rad a vstřícnost během celé mé rigorózní práce.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Kristýna Stehlíková

Konzultant: RNDr. Milan Mokřý, CSc.

Název rigorózní práce:

Validace HPLC metody stanovení některých vitamínů  
v multivitaminovém přípravku

Byla validována metoda pro simultánní stanovení vitamínů B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>3</sub> (nikotinamid), B<sub>6</sub> (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v komerčně vyráběných multivitaminových tabletách. Z validačních parametrů byla použita linearita, přesnost (provedena jako opakovatelnost), správnost, selektivita a robustnost.

Linearita metody byla potvrzena analýzou vzorků standardů v rozsahu 50 – 150 % očekávané koncentrace jednotlivých vitamínů.

Při provedení přesnosti byl šestkrát připraven roztok multivitaminu a následně byla vypočítána relativní směrodatná odchylka, která se u jednotlivých vitamínů pohybovala v rozmezí 0,9 – 1,61%.

Správnost byla ověřena analýzou modelových vzorků, připravených přidáním známého množství jednotlivých vitamínů k placebo. Výťažnost se pohybovala cca od 97 – 105 %.

Během selektivity bylo zjištěno, že ostatní látky přítomné v přípravku vzájemně neinterferují.

Při zkoušení robustnosti bylo zjištěno, že je třeba dodržovat složení i pH mobilní fáze.

Na závěr byl navržen test způsobilosti systému.

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmaceutical chemistry and drug analysis

Candidate: Mgr. Kristýna Stehlíková

Consultant: RNDr. Milan Mokřý, CSc.

Title of Thesis:

Validation of HPLC method for determination of some vitamins in  
a multivitamin product.

A method for simultaneous determination of concentrations of vitamins B<sub>1</sub> (thiamine), B<sub>3</sub> (nicotinamide), B<sub>6</sub> (pyridoxine) and vitamin C (ascorbic acid) in a multivitamin product by means of HPLC was validated. Linearity, precision (carried out as repeatability), accuracy, specificity and robustness were used as validation parameters.

Linearity was carried out with the assistance of method of dilution of standard solutions of vitamins in range 50 - 150% of expected concentrations of particular vitamins.

Solution of a multivitamin was prepared six-times for the precision experiment and then relative standard deviation was calculated. The relative standard deviation stayed in the range of 0.9 –1,61%.

Accuracy was verified by analysis of model samples prepared by addition of known amount of particular vitamins to placebo. Yield varied between 97-105%.

During the specificity experiments it was not found any interference among the other compounds presented in the multivitamin product.

Necessity of keeping given composition and pH of the mobile phase was found out during the robustness experiments.

System suitability test was designed finally.

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
2.1	CHROMATOGRAFIE .....	9
2.1.1	<i>Rozdělení chromatografických metod.....</i>	9
2.1.2	<i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....</i>	11
2.1.2.1	Vyhodnocování chromatografických křivek.....	12
2.1.2.2	Chromatograf .....	13
2.1.3	<i>Validace analytických metod .....</i>	18
2.1.3.1	Validační parametry.....	18
2.1.3.2	Validační zpráva .....	23
2.1.3.3	Revalidace analytické metody .....	24
2.2	VITAMÍNY .....	24
2.2.1	<i>Thiamin .....</i>	24
2.2.2	<i>Nikotinamid.....</i>	25
2.2.3	<i>Pyridoxin.....</i>	26
2.2.4	<i>Kyselina askorbová.....</i>	26
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>28</b>
4.1	MATERIÁL A POMŮCKY .....	28
4.2	VALIDOVANÁ METODA .....	29
4.3	PROVEDENÍ LINEARITY .....	30
4.4	PROVEDENÍ PŘESNOSTI .....	31
4.5	PROVEDENÍ SPRÁVNOSTI.....	32
4.6	PROVEDENÍ SELEKTIVITY .....	33
4.7	PROVEDENÍ ROBUSTNOSTI.....	33
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>35</b>
5.1	LINEARITA .....	35
5.1.1	<i>Kalibrační přímka pro thiamin.....</i>	35
5.1.2	<i>Kalibrační přímka pro pyridoxin.....</i>	36
5.1.3	<i>Kalibrační přímka pro nikotinamid .....</i>	37

5.1.4	<i>Kalibrační přímka pro kys. askorbovou</i> .....	38
5.1.5	<i>Zhodnocení linearity</i> .....	39
5.2	PŘESNOST .....	40
5.2.1	<i>Přesnost pro thiamin</i> .....	41
5.2.2	<i>Přesnost u pyridoxinu</i> .....	41
5.2.3	<i>Přesnost u nikotinamidu</i> .....	42
5.2.4	<i>Přesnost u kys. askorbové</i> .....	42
5.2.5	<i>Zhodnocení přesnosti</i> .....	43
5.3	SPRÁVNOST.....	43
5.3.1	<i>Správnost baňka č. 1</i> .....	43
5.3.2	<i>Správnost baňka č. 2</i> .....	44
5.3.3	<i>Správnost baňka č. 3</i> .....	44
5.3.4	<i>Správnost baňka č. 4</i> .....	44
5.3.5	<i>Správnost baňka č. 5</i> .....	45
5.3.6	<i>Správnost baňka č. 6</i> .....	45
5.3.7	<i>Zhodnocení správnosti</i> .....	45
5.4	SELEKTIVITA.....	46
5.5	ROBUSTNOST .....	49
5.5.1	<i>Zhodnocení robustnosti</i> .....	51
5.6	NÁVRH TESTU ZPŮSOBISLOSTI .....	51
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>53</b>

# 1 ÚVOD

V současné době je v oblasti kontroly léčiv vyvíjena snaha o získání rychlé, spolehlivé, jednoduché a pokud možno co nejlevnější metody pro stanovení požadované látky v daném přípravku. Většinu těchto požadavků splňuje mimo jiné vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Zabezpečuje rychlou a jednoduchou metodu stanovení obsahu látek v přípravku. V dnešní době je vysokoúčinný kapalinový chromatograf standardním vybavením každé kontrolně-analytické laboratoře a je tedy tato metoda relativně snadno dostupná. Mezi její další přednosti patří také možnost automatizace, potřeba malého množství vzorku, rychlost, citlivost a možnost současného kvalitativního i kvantitativního stanovení. Díky těmto výhodám se HPLC v dnešní době dynamicky rozvíjí.

Vitamíny jsou organické látky esenciální pro lidský organismus. Lidský metabolismus není schopen vitamíny syntetizovat, proto je nutné je získávat z potravy nebo doplňků stravy. V průmyslově rozvinutých zemích je nicméně nedostatek vitamínů vzácný díky pestré stravě, která je v těchto oblastech snadno dostupná. Trh s farmaceutickými doplňky stravy je v dnešní době nasycen nejrůznějšími přípravky typu „šumivý multivitamin“, který nabízí luxus získání řady vitamínů ve formě poměrně chutného a snadno připravitelného nápoje. Tyto přípravky, protože se jedná o doplňky stravy, ovšem nejsou sledovány Státním ústavem pro kontrolu léčiv z hlediska obsahu.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 CHROMATOGRAFIE

Název chromatografie je spojen se jménem ruského botanika a chemika M. S. Cvěta, který zjistil, že listová barviva procházejí kolonou s uhličitánem vápenatým nestejně rychle a lze je čistým rozpouštědlem postupně vymýt (1).

Chromatografie je separační metoda, kde se jednotlivé složky distribují mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Při chromatografickém procesu dochází k postupnému mnohokrát opakovanému ustavování rovnovážných stavů dělených látek mezi jednotlivými fázemi. Mezi dělenými látkami a fázemi dochází k vzájemným interakcím, které jsou předpokladem pro jejich separaci. Separace nastává na základě rozdílné afinity dělených látek k mobilní a stacionární fázi (2, 3).

#### 2.1.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství a lze je rozdělit podle různých hledisek do řady skupin:

- **Podle skupenství mobilní fáze:**
  - *Kapalinová chromatografie* (Liquid Chromatography - LC) - mobilní fází je kapalina, umožňuje rozdělení všech netěkavých kapalných látek i tuhých rozpustných v běžných organických rozpouštědlech nebo zředěných minerálních kyselinách (4).
  - *Plynová chromatografie* (Gas Chromatography - GC) - mobilní fází je plyn, umožňuje dělení plynných složek nebo látek, které lze zvýšením teploty, event. derivatizací, převést na plynné. Nosný plyn je volen podle detekčního systému, nejčastěji je používán dusík, argon, vodík nebo helium (4,5).

- **Podle uspořádání stacionární fáze:**

- *Kolonová chromatografie* – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně), například HPLC

- *Plošné techniky:*

*Papírová chromatografie* – dnes již překonaná

*Tenkovrstvá chromatografie* – dochází k rozdělování na tenké vrstvě, která je tvořena nejčastěji silikagelem, oxidem hlinitým křemičitanem hlinitým a dalšími, které jsou uloženy na podložce z hliníku, skla nebo plastu. Kvalitativní analýza je prováděna pomocí retenčního faktoru tj. poměru vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti start čelo (6,7).

- **Podle povahy děje, který převládá při separaci**

- *Rozdělovací chromatografie* – podstatou separace je rozdílná rozpustnost složek analyzované směsi ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách tvořících jednotlivé fáze. Stacionární fáze bývá vodná, zakotvená na hydrofilních nosičích (silikagel, křemelina, škrob, ...). Někdy bývá stacionární fáze organická zakotvená na hydrofobním nosiči, toto uspořádání je označováno jako chromatografie s obrácenými fázemi (reversed phase). Mobilní fáze může být použita plynná i kapalná (3, 8)
- *Adsorpční chromatografie* – podstatou je distribuce na základě rozdílné adsorpční afinity složek analyzované směsi. Její význam roste díky vývoji nových sorbentů i přístrojové techniky např. vysoce citlivých detektorů pro HPLC (9). Adsorbenty musí splňovat několik požadavků (zejména nerozpustnost, chemickou inertnost a velkou adsorpční kapacitu (10). Používají se zejména: silikagel = oxid křemičitý, křemičitan hořečnatý a mnoho dalších například různě modifikované adsorbenty (11).
- *Iontově-výměnná chromatografie* – podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, zpravidla v iontové formě, k iontovýměnným skupinám iontoměniče (3).
- *Gelová chromatografie* – složky jsou děleny na základě své velikosti a tvaru molekul. Gely určené pro chromatografii musí být chemicky

inertní, stálé i v širším rozmezí teplot. Používané jsou zejména dextranové, polyakrylamidové nebo agarosové gely (12).

- *Afinní chromatografie* – je založena na specifických reakcích funkčních skupin zabudovaných do syntetických molekul matrice. Jako matrice jsou používány agarosové nosiče a jejich deriváty, polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely atd. A jako afinanty se používají aminokyseliny, enzymy, antigeny a protilátky (13).

- **Podle pracovní techniky**

- *Frontální chromatografie*
- *Vytěšňovací chromatografie*
- *Eluční chromatografie* (8)

Možné rozdělení a označení chromatografických systémů podle jednotlivých použitých fází je přehledně popsáno v tabulce č. 1 přejaté od J. Nováka (14)

**Tabulka č. 1: Chromatografické systémy**

Stacionární fáze	Mobilní fáze	
	Kapalina	Plyn
<b>Pevná složka</b>	<b>LSC</b>	<b>GSC</b>
<b>Pevná složka + kapalina</b>	<b>LSLC</b>	<b>GSLC</b>
<b>Kapalina</b>	<b>LLC</b>	<b>GLC</b>

LSC, liquid-solid chromatography; GSC, gas-solid chromatography; LSLC, liquid-solid-liquid chromatography; GSLC, gas-solid-liquid chromatography; LLC, liquid-liquid chromatography; GLC, gas-liquid chromatography.

### 2.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High performance liquid chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik. Její uplatnění v technické praxi je velice rozsáhlé např.:

- Dělení a identifikace látek ve směsích
- Kontrola čistoty preparátů (kontrola syntézy)
- Čištění a mikropreparace látek
- Kvantitativní analýza látek ve směsi
- Kontrola všech výrobních stupňů
- Kontrola životního prostředí
- Analýza komponent tělních tekutin (obsah hormonů, steroidů, léčiv a jejich metabolitů v krvi nebo moči)
- Sledování čistoty výrobků, množství vitamínů v potravinářství
- Biologická a biochemická analýza (15)
- Analýza léčiv

Toto široké uplatnění metody je umožněno řadou podstatných předností, jako je možnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení složek směsi, rychlost analýzy, citlivost stanovení, minimální potřeba vzorku, možnost automatizace (3) a na rozdíl od plynové chromatografie možnost analýzy tepelně nestálých nebo netěkavých látek (16).

Při HPLC se obvykle pracuje tzv. eluční metodou. Při ní se složky v důsledku opakovaného ustavování rovnováhy pomalu pohybují kolonou a jsou nezávisle na druhých vymývány. Jejich pohyb je určován ternární interakcí složka-mobilní fáze-stacionární fáze. Jejich zóny (píky) jsou proto při postupu kolonou často odděleny zónou čisté mobilní fáze a nedotýkají se. Při analýze se používá buď stále stejná mobilní fáze (izokratická eluce) nebo je kolona postupně promývána několika eluenty, z nichž každý následující má vyšší eluční schopnost (gradientová eluce). Izokratická eluce je vhodná v případě, že se od sebe jednotlivé stanovované látky moc neliší v afinitě ke stacionární fázi a eluují se tedy v krátkých časových intervalech (8).

### **2.1.2.1 Vyhodnocování chromatografických křivek**

Základní kvalitativní veličinou je retenční (eluční) čas. Je to doba od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Porovnáním chromatografických dat stanovované látky a standardu (referenční látky) lze potvrdit identitu analyzovaného vzorku. Kvantitativní veličinou je plocha pod křivkou píku stanovované látky a je přímo

úměrná koncentraci stanovované látky. Pro kvantitativní hodnocení se nejčastěji využívají metody vnějšího nebo vnitřního standardu a metoda kalibrační přímky.

Metoda vnějšího standardu spočívá v porovnávání píku standardu v jednom nástřiku a píku stanovované látky v nástřiku druhém. Jako vnější standard se obvykle používá jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace látek se vypočítá jako poměr ploch píků.

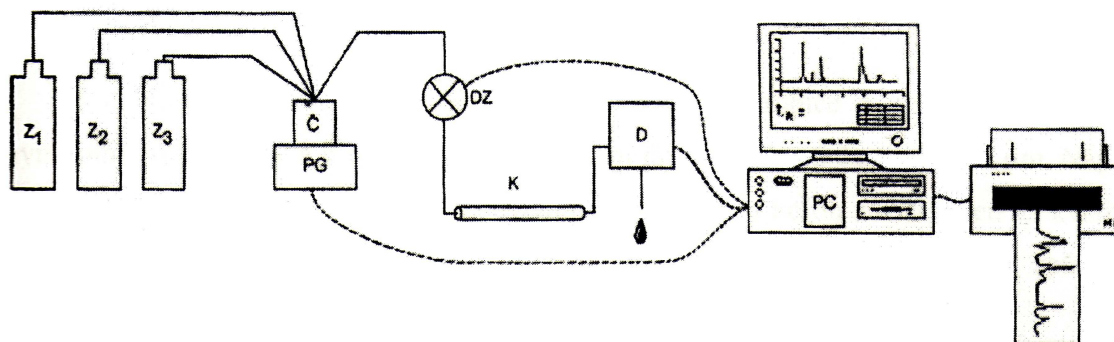
Metoda vnitřního standardu spočívá v přidání definovaného množství vnitřního standardu do vzorku a nastříknutí této směsi na kolonu. Koncentrace stanovované látky se vypočítá poměrem ploch píků. Tato metoda je méně časově náročná a přesnější - není zatížená chybou dvojího nástřiku. Nicméně výběr vhodného vnitřního standardu bývá složitý, protože musí jít o látku, která se bude eluovat v blízkosti píků stanovovaných látek, zároveň od nich ale bude oddělená a nesmí s těmito látkami chemicky reagovat (4,17).

Metoda kalibrační přímky se provede tak, že se stanoví vztah mezi měřeným signálem a koncentrací stanovované látky a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky se vypočítají z měřeného signálu pomocí inverzní funkce (18).

### **2.1.2.2 Chromatograf**

Koncepce kapalinového chromatografu může být pojata jako stavebnicový (modulární) systém, kde lze jednotlivé části chromatografu libovolně obměňovat, nebo jako kompaktní skříňová konstrukce. Modulární typ je vhodný zejména pro výzkum a vývoj nových pracovních metod, kompaktní jednotka je pak vhodná pro rutinní práci, protože má jednodušší obsluhu (19).

Základní komponenty jsou uvedeny na obrázku č. 1, zajišťují uskladnění a transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci.



**Obr. č. 1: Blokové schéma chromatografu**

$Z_1, Z_2, Z_3$  - Zásobníky mobilní fáze, Č - vysokotlaké čerpadlo, PG - programovací jednotka, DZ - dávkovací zařízení, K - chromatografická kolona, D - detektor, PC – počítač (3)

### ***Zásobníky mobilní fáze***

Zásobníky mobilní fáze jsou obvykle ze skla, oceli nebo plastu, opatřeny víčkem s dvěma vývody. Jedním je přiváděno helium nebo jiný inertní plyn, sloužící k odplynění mobilní fáze, druhým je odváděna mobilní fáze, která je čerpaná přes mikroporový filtr. U moderních kapalinových chromatografů je odplynovací zařízení součástí sestavy.

Jednotlivé chromatografické systémy jsou propojeny plastovými nebo ocelovými kapilárami (20).

### ***Čerpadla mobilní fáze***

Na čerpadla pro vysokoúčinné chromatografy jsou kladeny velké nároky. Musí být z materiálů odolávajících korozi i při použití agresivních mobilních fází. To splňuje např. ocel, titan a některé keramické materiály. Dále musí být schopna dávkovat plynule mobilní fázi bez kolísání (pulsů). Nastavení průtoku musí být přesné a reprodukovatelné. Vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší pro rychlou výměnu mobilní fáze nebo práci s gradientem (19).

K formování gradientu nebo k vytvoření izokratického systému mísením roztoku dochází buď mísením komponent před čerpadlem (na nízkotlaké straně), nebo za čerpadlem (na vysokotlaké straně). Podle zkušeností laboratorních pracovníků jsou obě možnosti rovnocenné (21).

### ***Zařízení pro dávkování vzorků***

Konstrukce dávkovače významně ovlivňuje účinnost separace. Při nedokonalém dávkování může totiž docházet k významnému rozšiřování elučních zón. Dávkování vzorků může být provedeno buď přímým nástřikem injekční stříkačkou přes vhodné septum, nebo dávkovacím ventilem se smyčkou bez přerušení toku mobilní fáze nebo pomocí automatických dávkovačů (autosamplerů), které umožňují dávkování řady vzorků za sebou bez přítomnosti obsluhy přístroje.

Dávkované vzorky musí být dokonale rozpuštěny, nejlépe v rozpouštědle podobného složení jako mobilní fáze (19).

### ***Chromatografické kolony***

Díky velkému množství aplikací vysokoúčinné kapalinové chromatografie existuje velké množství druhů chromatografických kolon, vyráběných většinou z oceli, speciálního skla nebo titanu. Délka kolon se pohybuje většinou v rozmezí 10 – 25 cm s vnitřním průměrem 3– 5 mm. Běžný průtok eluentu je do 1- 2 ml/min.

Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně využívány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými látkami (22).

Na HPLC kolony jsou kladeny vysoké nároky, musejí odolávat vysokým tlakům, mít vysokou účinnost, poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolekulárních látek (peptidů, proteinů, atp.) a měly by mít co nejvyšší permeabilitu (malý odpor i při vysokých průtocích mobilních fází), aby bylo možno dosáhnout rychlých separací. V naprosté většině aplikací současné HPLC se používají fázové systémy s obrácenými (převrácenými) fázemi, protože umožňují separace pestré škály organických látek od lipofilních až po silně polární či iontové látky.

Nejčastěji používaným nosičem pro přípravu HPLC kolon je stále silikagel, který se však v alkalických roztocích pozvolna rozpouští, což limituje volbu pH mobilních fází. Proto byly vyvinuty nové materiály pro HPLC se zlepšenými vlastnostmi.

Pro přípravu komerčních kolon pro HPLC se používají dva typy silikagelu sil-gel a sol-gel. Částice sol-gelu mají menší pórovitost než sil-gelu a pravidelnější uspořádání pórů a jsou potom mechanicky stabilnější než částice sil-gelů a pomaleji se rozpouštějí v alkalickém prostředí.

Tzv. „monomerní“ chemicky vázané stacionární fáze jsou připraveny pomocí monofunkčních silanizačních činidel. „Polymerní“ stacionární fáze jsou připravovány pomocí di- a trifunkčních silanů, mají celkově vyšší obsah chemicky vázané organické fáze. Polymerní stacionární fáze mají velké množství Si-O-Si můstků paralelních s povrchem silikagelového nosiče a jsou stabilní při pH 2 – 10.

Reakcí silikagelu se silanizačními činidly je možno ze sterických důvodů chemicky modifikovat nejvýše 50% původních silanolových skupin. Nezreagované zbytkové silanoly působí asymetrii píků basických látek, případně i jejich ireverzibilní adsorpci. Lze to částečně odstranit silanizací v dalším stupni (hexamethyldisilazanem pro přípravu stacionárních fází určených k analýze bazických látek, či trimethylchlorsilanem pro stacionární fáze vhodné pro separaci slabých kyselin). Pro přípravu fází se sníženou silanolovou aktivitou lze využít i silanizace v jediném stupni silanizačními činidly s objemnějšími postranními alkyly, např. diisopropylovými či *terc*-butylovými, které stericky brání přístupu složek vzorku k nezreagovaným silanolovým skupinám.

Problém s kolapsem chemicky vázaných alkylových řetězců při vysokém obsahu vody v mobilní fázi (při separaci velmi polárních látek) se řeší pomocí silanizačních činidel s polárními sekundárními amidovými či karbamátovými skupinami, které vytvoří vložku mezi silikagelem a dlouhými alkyly stacionární fáze.

Dnes jsou komerčně dostupné stacionární fáze s nejdelšími chemicky vázanými alkyly C<sub>30</sub>. Mají vysoce uspořádanou strukturu a jsou odolné vůči kolapsu v mobilních fázích s vysokým obsahem vody, kde je lze použít pro separace velmi polárních látek.

Novou užitečnou alternativu k běžným stacionárním fázím s chemicky vázanými oktadecylovými či oktylovými řetězci představují stacionární fáze s chemicky vázanými fluorouhlovodíkovými řetězci. Jsou výhodné odlišnou selektivitou.

Dalším druhem kolon pro HPLC jsou kolony na bázi oxidů kovů zejména: oxidu hlinitého, titaničitého a především zirkoničitého. Materiály na bázi oxidu zirkoničitého mají výbornou stabilitu (pH až 14) i tlakovou a tepelnou odolnost.

V poslední době se rozvíjí i vývoj čipů pro kapalinovou chromatografii. Tyto miniaturní destičky se převážně používají pro elektroforetické separace, stěny kanálků vyleptaných na křemíkových destičkách lze však pokrýt i organickými polymery či silikagelem typu sol-gel a využít pro elektrochromatografické separace. Další vývoj v této oblasti může směřovat k otevřeným kapilárním kolonám pro HPLC na čipech (23).

V souvislosti s vývojem a aplikací chirálně čistých léčiv sílí poptávka po vývoji nových metodik enantioseparací. Pro separace opticky aktivních látek se nejčastěji



využívá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v uspořádání, kdy k enantioseparaci dochází na stacionární fázi s navázanou opticky čistou látkou – chirálním selektorem (CS). Jeden ze současných trendů ve vývoji nových chirálních stacionárních fází směřuje k modifikaci již zavedených chirálních selektorů nebo k dosažení vyššího pokrytí nosiče chirálním selektorem. Účelem tohoto přístupu je získat další možnosti pro stereoselektivní interakci analytu 24.

Dnes se používají i monolitické kolony, které jsou tvořeny jediným kusem pórovitého materiálu. Ten zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Výhodou je vysoká odolnost vůči tlaku a s tím související možnost použít vyšší průtokové rychlosti (25).

### ***Detektory pro HPLC***

Detektory monitorují eluované látky z kolony. Jsou na ně kladeny vysoké požadavky jako je vysoká citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost (16).

Nejčastějším detektorem je **spektrofotometrický**, protože většina látek je schopna absorbovat v ultrafialové (UV) nebo viditelné oblasti. Používá se UV detektor s fixní vlnovou délkou, UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou, skenovací UV detektor. Citlivost těchto detektorů je velmi vysoká ( $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml). Lze je využít i ke gradientové eluci.

**Fluorimetrické detektory** jsou použitelné pokud analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Některé nefluoreskující látky lze derivatizovat na fluoreskující deriváty. Jsou méně univerzální, zato citlivější ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml) a selektivnější a lze je užít pro gradientovou eluci.

**Refraktometrické detektory** pracují na základě rozdílného indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze unášející separovanou látku a jsou proto univerzální. Nevýhodou je jejich malá citlivost a nelze je užít při gradientové eluci.

**Mikroadsorpční detektory** pracují na základě adsorpčního a desorpčního tepla, které zaznamenávají v závislosti na proteklém eluátu. Vyhodnocování chromatogramů je mnohem složitější.

**Elektrochemické detektory** využívají dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda – eluent, detekovat se dají oxidovatelné nebo redukovatelné látky. Jejich citlivost je srovnatelná s fluorimetrickými detektory.

V poslední době je užíváno též spojení HPLC s **hmotnostní spektroskopií (MS)**. Toto spojení je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů pro identifikaci léčiv. Velký význam má hmotnostní detekce při hodnocení stopových množství různých látek – nečistot, metabolitů apod. Nicméně jsou velmi finančně náročné (3, 26).

### 2.1.3 Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, kterým se prostřednictvím specifických testů potvrzuje, že vybraný analytický postup je vhodný pro dané praktické použití. Je integrovanou součástí každého dobře připraveného analytického postupu (27).

Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný a zajistit stejnou spolehlivost a použitelnost při opakovaném použití v jedné i různých laboratořích (17).

Analytické metody je nutné validovat a revalidovat před jejich uvedením do praxe, při jakékoli změně podmínek nebo změně v běžném postupu metody, nebo má – li být metoda přenesena do jiné laboratoře (17, 27).

Způsob provedení validace by měl být postavený na základě jejího předpokládaného využití. Není vždy nutné validovat veškeré analytické parametry.

#### 2.1.3.1 Validační parametry

##### *Správnost*

Správnost analytické metody je rozsah, v rámci kterého se výsledky dosažené danou metodou shodují se skutečnými hodnotami. Může být brána i jako oblast shody stanovené hodnoty a hodnoty přijaté jako konvenční, skutečné nebo hodnoty přijatelnosti výsledků.

Zjištění správnosti se může provést různými způsoby:

- porovnáním výsledků metody a metody referenční (je nutné, aby byla známa nepřesnost referenční metody)
- analýzou vzorku se známou koncentrací a porovnáním zjištěné hodnoty se skutečnou

- přípravou modelového vzorku ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu
- analýzou přípravku s přesně známým přídatkem standardu

Správnost se obvykle zajistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost (17).

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 * \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

Pro orientaci může sloužit tabulka č. 2, přejatá z literatury (28), kde jsou uvedeny stanovené hodnoty výtěžnosti v závislosti na koncentraci.

**Tabulka č. 2: Orientační výtěžnost při rozdílných koncentracích**

Analytická koncentrace (%)	Výtěžnost	RSD (%)
100	98-102	1,3
≥10	98-102	2,8
≥1	97-103	2,7
≥0,1	95-105	3,7
0,01	90-107	5,3
0,001	80-110	7,3
0,0001	80-110	11
0,00001	80-110	15
0,000001	60-115	21
0,0000001	40-120	30

### ***Přesnost***

Přesnost je definována jako míra shody mezi výsledky opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Vyjádří se jako relativní směrodatná odchylka šesti kompletních analýz včetně přípravy vzorku.

Přesnost může být dokumentována ve třech úrovních:

**Opakovatelnost** uskutečněná v jeden den, na jednom přístroji a jedním pracovníkem

**Mezilehlá (intermediální) přesnost** – určují se různé vlivy na přesnost metody (rozdílů pracovníků, zařízení, různé dny nebo kombinace těchto faktorů)

**Reprodukovatelnost** – hodnocení v různých laboratořích (17, 27).

V převzaté tabulce č. 2 jsou uvedeny pro orientaci hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) ve spojitosti s koncentrací analyzované látky v přípravku.

### ***Selektivita***

Selektivita je schopnost metody správně a specificky analyzovat stanovovanou látku v přítomnosti látek jiných (pomocných, dalších účinných, nečistot nebo látek neznámých). Hodnocení selektivity by se mělo provádět při zkouškách na totožnost, čistotu a obsah. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty.

### ***Detekční limit (limit of detection, LOD)***

Je to nejnižší koncentrace analyzované látky ve vzorku, která je detekovatelná, ale není bezpodmínečně kvantifikovaná. Detekční limit může být stanoven různými postupy.

Metoda založená na vizuálním hodnocení je vhodná zejména pro neinstrumentální, někdy i instrumentální metody, kdy se analyzují vzorky se známou koncentrací a určí se minimální koncentrace, při které je stanovovaná látka detekovatelná.

Metodu založenou na stanovení poměru signál – šum lze užít u metod instrumentálních, které vykazují šumovou linii. Vyhodnotí se minimální koncentrace látky, kdy je poměr signálu k šumu 3:1 nebo 2:1.

Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku.

### ***Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)***

Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Na stanovení kvantitativního limitu lze použít několik metod. Například metodu založenou na

vizuálním hodnocení, kdy se analyzují vzorky se známými koncentracemi a určí se tak minimální koncentrace s přijatelnou přesností a správností.

Dále lze použít metodu signál-šum, kdy se určí minimální koncentrace, při které se může stanovovaná látka spolehlivě kvantifikovat. Typický je poměr signálu k šumu 10:1.

Dále potom lze užít metodu založenou na stanovení relativní směrodatné odchylky. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10% (17, 27).

### ***Linearita***

Je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů, protože rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Pokud je metoda lineární, lze s výhodou určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, je třeba výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky (17).

### ***Rozsah (range)***

Rozsah se definuje jako interval mezi horní a dolní hranicí obsahu stanovované látky, při které je látka stanovována s dostatečnou přesností, správností a linearitou. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být učen maximální odezvou, kdy ještě přístroj pracuje přesně (17, 27).

### ***Odolnost (ruggedness)***

Je definována jako stupeň reprodukovatelnosti výsledků zkoušek získaných analýzou stejných vzorků při různých podmínkách (např. v různých laboratořích, provedené různými pracovníky, různými přístroji, s různými činidly,...) (27).

### ***Robustnost (robustness)***

Udává míru schopnosti metody odolat malým výkyvům parametrů. Cílem je upozornit na výkyvy, které mohou ovlivnit výsledky metody. Při kapalinové

chromatografii jsou typické proměnné: vliv změny pH mobilní fáze, vliv změn složení mobilní fáze, rozdílné kolony, teplota, průtoková rychlost (17, 27).

### ***Stabilita***

Určuje stabilitu vzorku v roztoku, kdy se vzorek i standard uchovávají při definovaných podmínkách, v definovaných obalech. A ve stanovovaných intervalech jsou analyzovány. Výsledkem je doporučené časové období a způsob skladování, při kterých lze vzorky používat (27).

### **Způsobilost systému**

Představuje nedílnou součást validace analytické metody. U instrumentálních fyzikálně – chemických metod (především separačních) není v podstatě možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby poskytovala spolehlivé výsledky. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Při splnění požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí (17).

U kapalinové chromatografie lze pro test způsobilosti použít například tyto charakteristiky:

#### **Faktor symetrie ( $A_s$ )**

Vypočítá se ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

kde značí:

$w_{0,05}$  šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky

$d$  vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.

### Rozlišení

Tímto parametrem se rozumí vzdálenost píků dvou složek. Rozlišení se vypočítá ze vztahu:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde značí:

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků  
 $w_{h1}$  a  $w_{h2}$  šířky píků v poloviční výšce

**Maximální dovolená relativní směrodatná odchylka (RSD%)** ploch hlavního píku pro opakované nástřiky

v procentech pro řadu po sobě následných měření se vypočítá podle vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

kde značí:

$y_i$  jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu (18)  
 $\bar{y}$  průměr jednotlivých ploch  
 $n$  počet jednotlivých hodnot

#### 2.1.3.2 Validační zpráva

Po vývoji a validaci metody je potřebné připravit validační zprávu obsahující tyto součásti:

Rozsah vybrané metody, celkový přehled metody, typ směsí, sloučenin a jejich struktura, všechny chemické látky, činidla, referenční standardy, vzorky a jejich zdroj nebo přípravu, postupy pro kontrolu kvality použitých standardů a ostatních chemikálií,

bezpečnostní opatření, program na zavedení metody z vývoje do laboratorní analytické praxe, parametry metody, ...

### 2.1.3.3 Revalidace analytické metody

Podmínky revalidace systému nejsou obecně definovatelné, protože každá změna v celém analytickém systému vede zákonitě k jeho revalidaci. Každá změna musí být však posouzena individuálně, zda má prokazatelný vliv na konečný výsledek. V kladném případě je nutné provést revalidaci, avšak tato revalidace nemusí být komplexní, ale pouze jako dílčí krok validačního programu (např. kalibrace, citlivost) s tím, že musí být zpětně určena směrodatná odchylka (resp.  $R_{\max}$ ) a zda tato změna nemá vliv na velikost  $R_{\max}$  (29).

## 2.2 VITAMÍNY

Vitamíny jsou organické látky esenciální pro lidský organismus. Lidský organismus není schopen si vitamíny syntetizovat sám, ale je nutné, aby je přijímal v potravě. Při jejich nedostatečném přísunu může docházet k jejich nedostatku (hypovitaminóze) naopak jsou-li přijímány ve větším množství může, zejména u vitamínů rozpustných v tucích, docházet k jejich nadbytku (hypervitaminóze).

Vitamíny jsou indikovány při jejich nedostatku jako substituční léčba. Nicméně v dnešní době v rozvinutých zemích je hypovitaminóza méně častá. Někdy ale mohou některé podávané léky způsobit snížené množství vitamínů (30, 31, 32).

Tato práce se zabývá vitamíny B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>3</sub> (nikotinamid), B<sub>6</sub> (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová), a proto budou tyto stručně zmíněny.

### 2.2.1 Thiamin

**Synonyma:** Thiaminium dichloratum, vitamin B<sub>1</sub>, Thiamini hydrochloridum

**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS

**M<sub>r</sub>** = 337,27



**Chemický název:** 3-[(4-amonio-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumdichlorid

**Vlastnosti:** Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v glycerolu, těžce rozpustný v lihu 96% (18).

Thiamin se vyskytuje zejména v neloupané rýži, kvasnicích a podobně. Nedostatek thiaminu se projevuje jako beri-beri (vlhká, napadající kardiovaskulární systém nebo suchá, napadající nervový systém). V dnešní době se již tato choroba nevyskytuje, nicméně se lze setkat s nedostatkem thiaminu. Zvýšená potřeba je zejména v době těhotenství nebo při alkoholismu. Přebytek thiaminu je vylučován močí a není ukládán v těle (31, 32).

Co se týče zvířat, vitamíny skupiny B jsou důležité zejména pro intenzivně rostoucí drůbež, prasata a též mláďata, jejichž schopnost tvorby těchto vitaminů je limitována. U dospělých zvířat jsou vitamíny skupiny B syntetizovány v dostatečném množství bachorovou a střevní mikroflórou (33, 34).

### 2.2.2 Nikotinamid

**Synonymum:** Niacinamid

**Sumární vzorec:**  $C_6H_6N_2O$

**Mr** = 122,13

**Chemický název:** Amid kyseliny 3-pyridinkarboxylové

**Vlastnosti:** Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu (18).

Přirozeným zdrojem nikotinamidu jsou játra, maso, vejce, ořechy a luštěniny. Hypovitaminóza se projevuje poškozením kůže a sliznic, v extrémních případech se vyvíjí tzv. nemoc tří D – dermatitis, diarea, demence. Bývá indikován při zánětech žil a i mírně snižuje cholesterol (31, 32).

### 2.2.3 Pyridoxin

**Synonyma:** Pyridoxolium chloratum, Pyridoxinium chloratum, vitamin B6

**Sumární vzorec:**  $C_8H_{12}ClNO_3$

**Mr=** 205,64

**Chemický název:** 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridiniumchlorid

**Vlastnosti:** Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%. Taje při asi 205 °C, za rozkladu (18).

Zdrojem pyridoxinu jsou játra, ryby, mléko, celozrnná mouka, banány. Při nedostatku se zvyšuje riziko neuromuskulárního dráždění a tedy možnost vzniku křečí. Jinak ale jeho nedostatek nebývá izolovaný od ostatních vitamínů. Dalším znakem nedostatku tohoto vitamínu je sideroplastová anémie.

Pyridoxin má řadu lékových interakcí (31, 32).

### 2.2.4 Kyselina askorbová

**Synonymum:** Vitamin C

**Sumární vzorec:**  $C_6H_8O_6$

**Mr =** 176,13

**Charakteristika:** (R)-5-[(S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5H-furan-2-on.

**Vlastnosti :** Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkostí mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru. Taje při asi 190 °C, za rozkladu (18).

Zdrojem vitamínu C je ovoce a zelenina, zejména citrusové plody, papriky, kiwi... Tento vitamín podporuje vyžrávání pojiva, hojení ran, vývin zubů. Podílí se na hydroxylaci steroidů. Klasická avitaminóza, projevující se otokem sliznic, ztrátou zubů, vadnou osifikací a poškozením kapilár se vznikem podkožních hemoragií je velmi známá jako kurděje. V dnešní době už se téměř nevyskytuje. Vitamin C se velmi často používá na podporu léčby chřipkových onemocnění (31, 32).

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo provést validaci již vyvinuté chromatografické metody pro simultánní stanovení čtyř vitamínů rozpustných ve vodě (thiamin, nikotinamid, pyridoxin a kys. askorbová) pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Validaci vyhodnotit a navrhnout test způsobilosti.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL A POMŮCKY

#### *Použité chemikálie:*

Aneurine hydrochloride (Thiamin hydrochlorid), Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England

Pyridoxine hydrochloride, Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England

Kyselina listová (Folic acid), USP XVI, Koch-light Laboratories Ltd Coinbrook Bucks, England

Nikotinamid (Nicotinamide), Loba Feinchemie, Fischamed, Rakousko

Riboflavin, Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England

Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalaminum), Léčiva, ČR

Kyselina askorbová (Acidum ascorbicum), ČL 2005, Farmakon Olomouc, ČR

Calcium-D(+)-pantothenat, Merck, Darmstadt

Tokoferol-acetát, Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England

Betakaroten, Loba Feinchemie, Fischamed, Rakousko

E110 (Žlut' SY), Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Aspartam, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Sacharin sodná sůl, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Methanol gradient grade, Merck, Darmstadt, Německo

Sodná sůl kyseliny hexansulfonové aprox. 98% (SHS), Sigma-Aldrich, Německo

Triethylamin purum  $\geq 98\%$  (GC), Fluka, Švýcarsko

Kyselina octová p.a., Lachema, Brno, Česká republika

Voda čištěná reverzní osmózou

#### *Kolony*

Chromatografická kolona - 250x4 mm I.D. s náplní Lichrosphere 100 RP C18, 5  $\mu\text{m}$ , Merck, Německo

### ***Přístroje***

Acidimetr 333, Druopta Praha, Česká republika

Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovensko

Kapalinový chromatogram, Agilent 1100 series, HPST, s. r. o., Praha, ČR

Analytické váhy AND, Helago, Česká republika

### ***Ostatní***

Laboratorní sklo

Vakuová vývěva pro filtraci

## **4.2 VALIDOVANÁ METODA**

V diplomové práci (35), na kterou tato rigorózní práce navazuje byla vypracována metoda pro analytické hodnocení vitamínů B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>3</sub> (nikotinamid), B<sub>6</sub> (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová) v multivitaminových tabletách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí a izokratickou elucí. Zde je uveden stručný přehled vypracované metody:

***Zkoušený roztok.*** 5 šumivých tablet se rozdrobní a zředí vodou na 500,0 ml. Před nástřikem na kolonu se část roztoku zfiltruje.

***Porovnávací roztok (1).*** Naváží se pracovní standardy: 7,0 mg thiaminu, 10,0 mg pyridoxinu, 90,0 mg nikotinamidu a 300,0 mg kys. askorbové. Tyto navážené pracovní standardy se zředí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 10,0 ml.

***Porovnávací roztok (2).*** Naváží se pracovní standardy: 9,0 mg thiaminu, 15,0 mg pyridoxinu, 140,0 mg nikotinamidu, 450,0 mg kys. askorbové. Tyto navážené pracovní standardy se zředí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 10,0 ml.

***Porovnávací roztok (3).*** Naváží se pracovní standardy: 14,0 mg thiaminu, 20,0 mg pyridoxinu, 180,0 mg nikotinamidu, 600,0 mg kys. askorbové. Tyto navážené pracovní standardy se zředí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (4).** Naváží se pracovní standardy: 18,0 mg thiaminu, 25,0 mg pyridoxinu, 220,0 mg nikotinamidu, 750,0 mg kys. askorbové. Tyto navážené pracovní standardy se zředí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (5).** Naváží se pracovní standardy: 21,0 mg thiaminu, 30,0 mg pyridoxinu, 270,0 mg nikotinamidu, 900,0 mg kys. askorbové. Tyto navážené pracovní standardy se zředí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 10,0 ml.

**Hodnocení:** Pomocí kalibrační křivky sestrojené z porovnávacích roztoků (1-5).

**Kolona:** 250 mm x 4 mm I.D. s náplní Lichrosphere 100 RP C18 (5µm) firmy Merck, Německo.

**Mobilní fáze:** methanol: voda v poměru 20:80 (v/v), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH se upraví na 2,8 pomocí 10% kys. octové.

**Průtoková rychlost:** 1 ml/min.

**Detekce:** spektrofotometrický detektor, 270 nm.

**Nástřik:** 10 µl

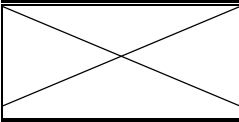
## 4.3 PROVEDENÍ LINEARITY

Linearita byla ověřena již v diplomové práci (35) při kvantitativním stanovení pomocí kalibrační přímky, přípravou pěti porovnávacích roztoků, metodou přesného navažování jednotlivých vitamínů. V této práci byla pro ověření linearity zvolena metoda ředění zásobních roztoků jednotlivých vitamínů. Tato druhá metoda byla zvolena pro možnost srovnání obou metod (pracnost, přesnost, spolehlivost).

Pro thiamin, pyridoxin a nikotinamid byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Pro kys. askorbovou byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml. Do 100 ml odměrných baněk označených čísly 1-5 byly z jednotlivých zásobních roztoků napipetovány stanovené objemy. Odměrné baňky o objemu 100 ml byly následně doplněny vodou po rysku.

Jednotlivé pipetované objemy a finální koncentrace v roztocích jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

**Tabulka č. 3: Koncentrace a pipetované objemy jednotlivých vitamínů v odměrných baňkách**

Baňka číslo	1	2	3	4	5
	Koncentrace [mg/ml]				
	Pipetovaný objem [ml]				
<b>Thiamin</b>	0,007	0,009	0,014	0,018	0,021
	0,7	0,9	1,4	1,8	2,1
<b>Pyridoxin</b>	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
<b>Nikotinamid</b>	0,09	0,14	0,18	0,22	0,27
	9,0	14,0	18,0	22,0	27,0
<b>Kys. askorbová</b>	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90
	3	4,5	6,0	7,5	9,0

#### 4.4 PROVEDENÍ PŘESNOSTI

Přesnost pro tuto práci byla provedena jako opakovatelnost. Byla tedy zopakována příprava vzorku šumivého multivitaminu jedním pracovníkem, stejnou metodou a měření bylo provedeno na jednom přístroji.

Tablety šumivého multivitaminu byly jednotlivě očištěny štětečkem a každá byla zvážena. Celkem bylo zváženo 15 tablet a z jednotlivých hodnot byla vypočítána průměrná hmotnost jedné tablety.

**Průměrná hmotnost jedné tablety byla: 2,6502 g**

V třence bylo rozdrceno na prach 8 tablet šumivého multivitaminu a do šesti 100 ml odměrných baňek označených čísly 1-6 bylo naváženo 2,65 g prachu. Prach byl opatrně rozpuštěn a doplněn vodou po rysku. Část roztoků byla vždy zfiltrována a naplněna do vialky. Vzniklé přefiltrované roztoky šumivého multivitaminu byly následně pětkrát nastříknuty na kolonu.

## 4.5 PROVEDENÍ SPRÁVNOSTI

Provedení správnosti by bylo nejjednodušší použitím placebo šumivého přípravku. Nicméně placebo pro vypracování této práce nebylo k dispozici, proto bylo podle složení na obalu přípravku připraveno placebo vlastní. Směs placebo byla připravena z následujících pomocných látek:

- Kys. citronová
- Sorbitol
- Hydrogenuhličitan sodný
- Aspartam
- E 110
- Betakaroten

Dále bylo připraveno 6 odměrných baněk (100 ml). Do každé byl navážen standard vitamínu v množství předpokládaném podle hodnot uvedených na obalu. Koncentrace jednotlivých standardů vitamínů podle hodnot uváděných na obalu jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4: Navažovaná množství standardů vitamínů pro měření správnosti**

	Koncentrace [mg/100 ml]
Thiamin	1,4
Nikotinamid	18,0
Pyridoxin	2,0
Kys. askorbová	60,0

K 2,57 g placebo byla přidána navážka vitamínu tak, aby výsledné množství bylo stejné jako jedna tableta šumivého multivitaminového přípravku. Směs byla opatrně rozpuštěna, promíchána a doplněna vodou po rysku. Část roztoku byla zfiltrována a filtrát byl nastříkovan na kolonu. Každý vzorek byl analyzován celkem třikrát.



## 4.6 PROVEDENÍ SELEKTIVITY

Byly postupně nastříkovány všechny látky, uvedené ve složení přípravku, pro zjištění, zda mohou ovlivňovat výsledky metody. Nastříkovány byly nejprve ostatní vitamíny v přípravku:

- Biotin
- B<sub>12</sub> (cyanocobalamin)
- Kyselina listová
- Riboflavin
- Calcium pantothenát
- Tokoferol acetát

Následně byly nastříknuty pomocné látky uvedené na přípravku:

- Sacharin
- Aspartam
- E 110
- Betakaroten

## 4.7 PROVEDENÍ ROBUSTNOSTI

Při zkoušení robustnosti byly zkoušeny 4 obměny mobilní fáze. Pro přehlednost je uvedena mobilní fáze nalezená jako optimální:

- *methanol: voda v poměru 20:80 (v/v), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH se upraví na 2,8 pomocí 10% kys. octové.*

**Obměna mobilní fáze byla provedena změnou poměrů methanolu a vodné části:**

- *methanol: voda v poměru 25:85 (v/v), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH upraveno na 2,8 pomocí 10% kys. octové*

- *methanol: voda v poměru 15:75 (v/v ), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH upraveno na 2,8 pomocí 10% kys. octové*

**Obměna mobilní fáze byla provedena změnou pH vodné části:**

- *methanol: voda v poměru 20:80 (v/v), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH upraveno na 3,3 pomocí 10% kys. octové*
- *methanol: voda v poměru 20:80 (v/v), vodná fáze: 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové, 0,1 % triethylaminu, pH upraveno na 2,3 pomocí 10% kys. octové*

Nastříkovan byl zkoušený roztok šumivého multivitamínu (1 tableta rozpuštěná v odměrné baňce o objemu 100 ml).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

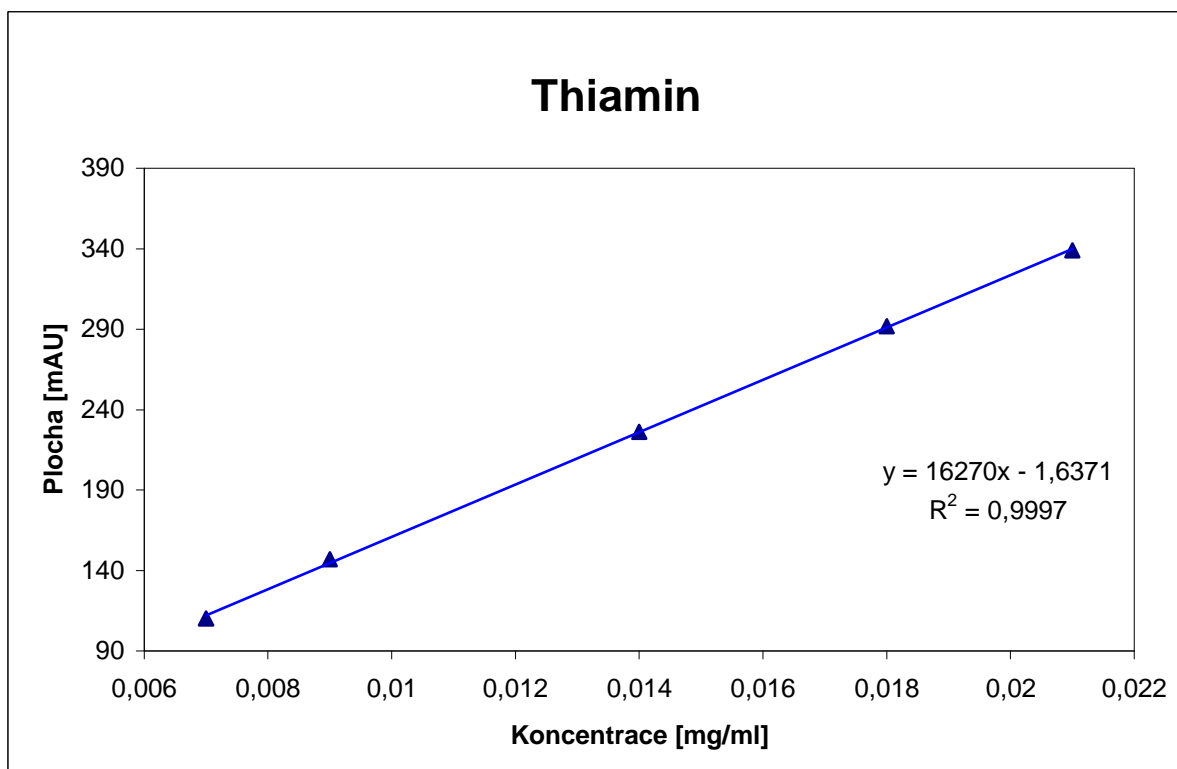
### 5.1 LINEARITA

V následujících podkapitolách jsou uvedeny v tabulkách číslo 5-8 plochy píků [mAU] v závislosti na koncentracích daného vitamínu [mg/ml]. Následně byly vytvořeny grafy (obr. č. 2-5), kde jsou uvedeny směrnice přímk a hodnoty korelačních koeficientů.

#### 5.1.1 Kalibrační přímka pro thiamin

Tabulka č. 5: Plochy píků pro jednotlivé nástříky thiaminu

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřík 1 [mAU]	Nástřík 2 [mAU]	Nástřík 3 [mAU]	Průměr [mAU]
1	0,007	111,0	109,9	109,8	110,2
2	0,009	146,7	147,2	147,0	147,0
3	0,014	226,1	226,2	226,0	226,1
4	0,018	295,1	291,0	290,0	292,0
5	0,021	339,0	338,8	339,5	339,1

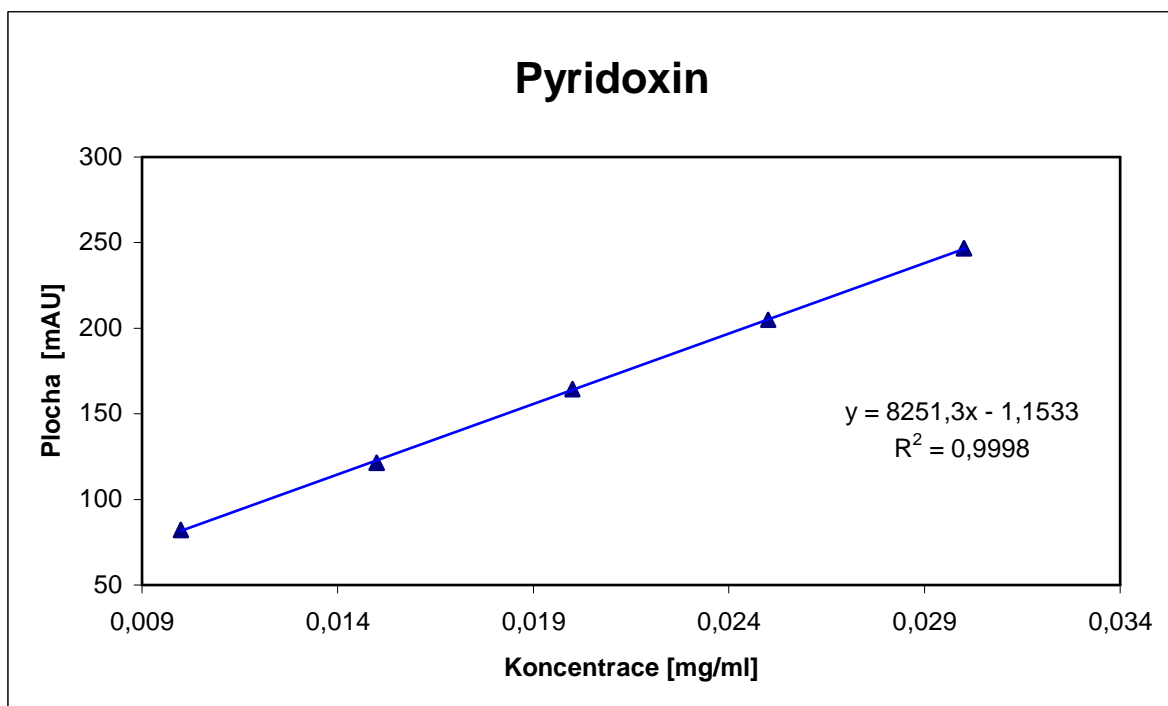


**Obr. č. 2: Závislost plochy píků a koncentrace thiaminu**

### 5.1.2 Kalibrační přímka pro pyridoxin

**Tabulka č. 6: Plochy píků pro jednotlivé nástříky pyridoxinu**

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřík 1 [mAU]	Nástřík 2 [mAU]	Nástřík 3 [mAU]	Průměr [mAU]
1	0,010	83,0	84,9	78,4	82,1
2	0,015	121,5	121,3	121,1	121,3
3	0,020	164,7	164,5	164,3	164,5
4	0,025	206,6	204,3	203,7	204,9
5	0,030	246,7	246,5	246,6	246,6

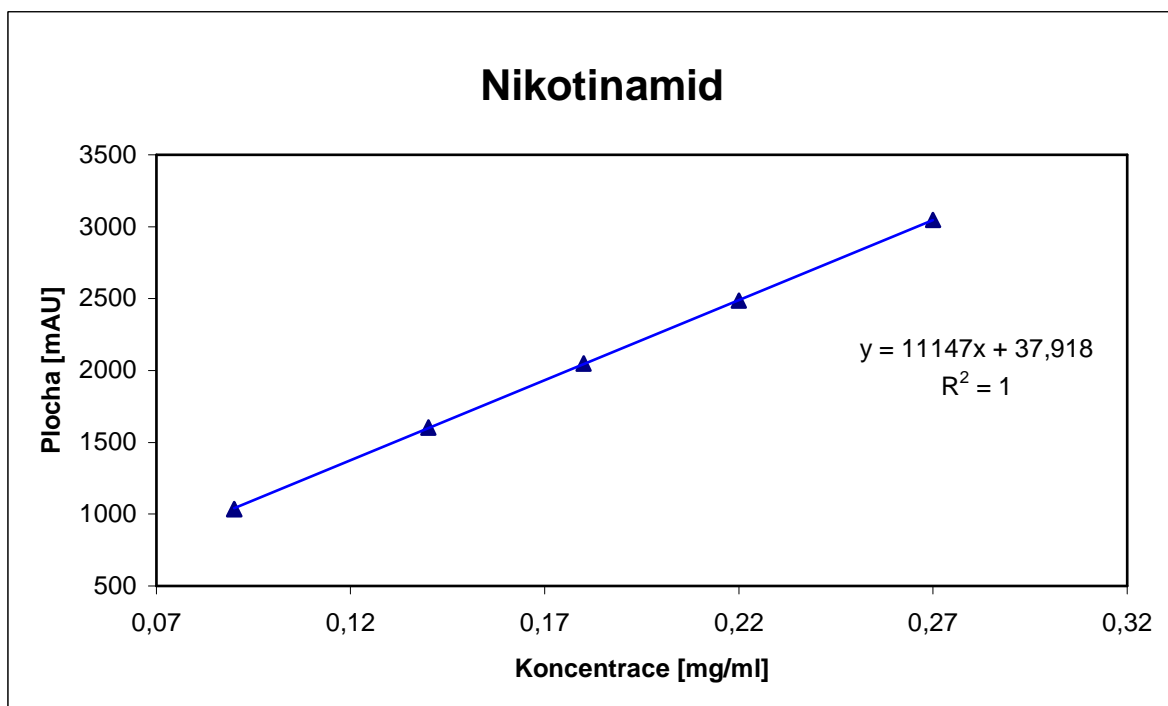


Obr. č. 3: Závislost plochy píků a koncentrace pyridoxinu

### 5.1.3 Kalibrační přímka pro nikotinamid

Tabulka č. 7: Plochy píků pro jednotlivé nástřiky nikotinamidu

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1 [mAU]	Nástřik 2 [mAU]	Nástřik 3 [mAU]	Průměr [mAU]
1	0,09	1042,6	1043,2	1022,4	1036,1
2	0,14	1603,9	1601,7	1603,0	1602,9
3	0,18	2050,2	2050,7	2048,6	2049,8
4	0,22	2501,9	2480,4	2478,9	2487,1
5	0,27	3049,8	3043,9	3043,8	3045,8

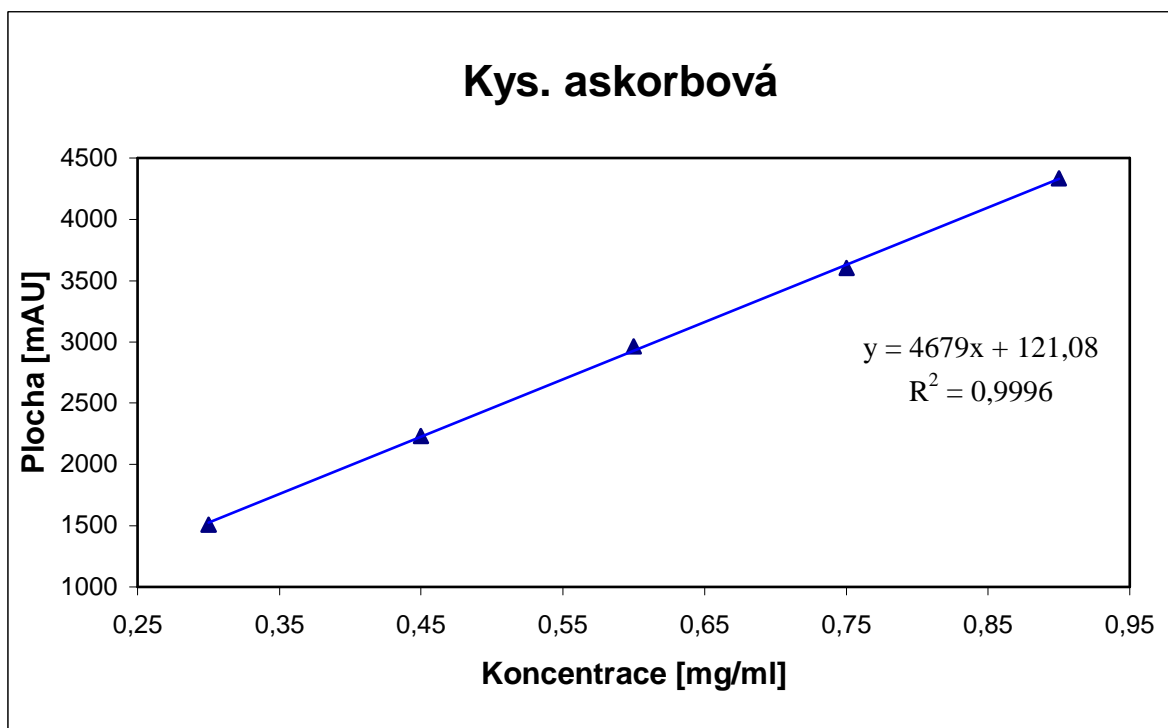


Obr. č. 4: Závislost plochy píků a koncentrace nikotinamidu

#### 5.1.4 Kalibrační přímka pro kys. askorbovou

Tabulka č. 8: Plochy píků pro jednotlivé nástřiky kys. askorbové

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1 [mAU]	Nástřik 2 [mAU]	Nástřik 3 [mAU]	Průměr [mAU]
1	0,30	1480,8	1517,4	1532,3	1510,2
2	0,45	2239,6	2229,8	2225,0	2231,5
3	0,60	2967,9	2965,0	2958,7	2963,9
4	0,75	3619,0	3602,4	3589,7	3603,7
5	0,90	4342,0	4331,0	4327,0	4333,3

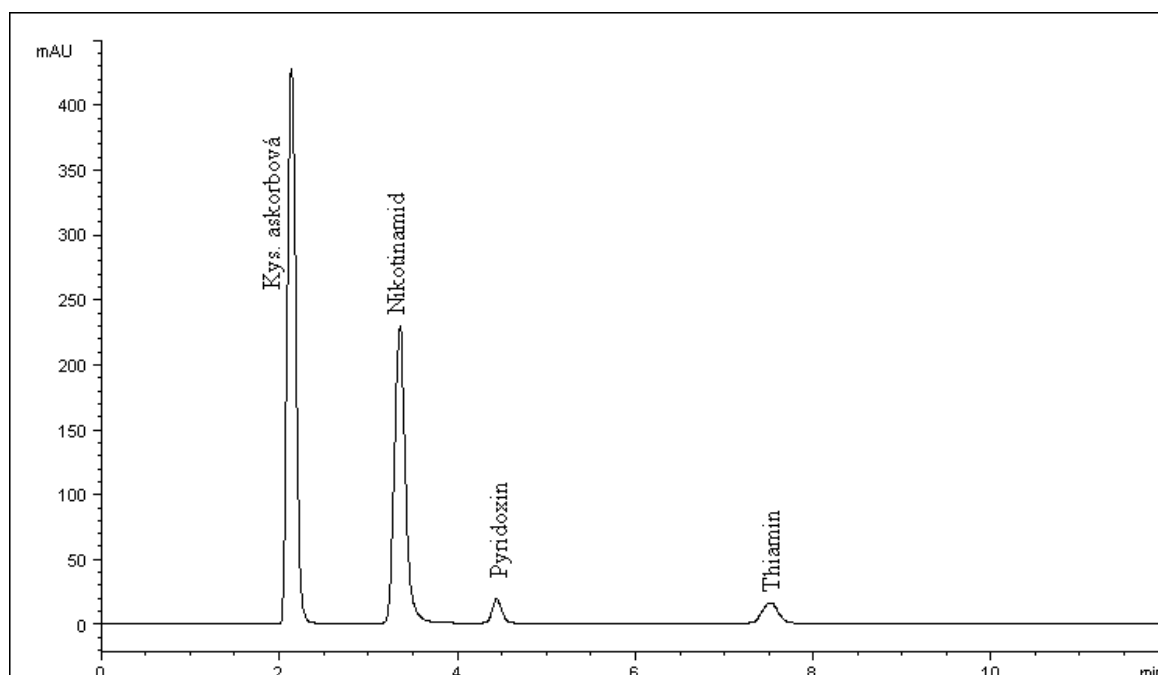


**Obr. č. 5: Závislost plochy píků a koncentrace kys. askorbové**

### **5.1.5 Zhodnocení linearity**

Z uvedených grafů (obr. č. 2- 5) je vidět, že provedení linearity bylo poměrně přesné. Srovná-li se s provedením kalibračních přímek v diplomové práci (35), lze říci, že obě zvolené metody jsou dostatečně přesné. Provedení pomocí ředění zásobních roztoků vitamínových standardů je o něco přesnější a spolehlivější než metoda přesného navažování standardů. Je nutné říci, že metoda zvolená v této práci je také méně náročná a rychlejší. Hodnoty korelačních koeficientů se pohybují v rozmezí 0,9996 až 1.

Na ukázkou je na obr. č. 6 uveden chromatogram standardů vitamínů.



**Obr. č. 6: Ukázka chromatogramu standardů pro kalibrační přímku**

## 5.2 PŘESNOST

Následující podkapitoly jsou věnovány jednotlivým stanovovaným vitamínům v šumivém přípravku. V tabulkách č. 9 až 12 jsou uvedeny hodnoty ploch píku. V předposledním sloupci tabulky je uveden průměr hodnot pěti nástříků. V posledním sloupci jsou uvedeny vypočítané koncentrace daných vitamínů podle rovnic přímek z obrázků č. 2 – 5. Pod tabulkou je uvedena výsledná hodnota relativní směrodatné odchylky vypočítané ze vzorce uvedeného na straně č. 23. Relativní směrodatná odchylka byla vypočítána pro plochy pod křivkou i koncentrace vitamínů.



### 5.2.1 Přesnost pro thiamin

Tabulka č. 9: Hodnoty ploch píků u vzorků pro přesnost pro thiamin a jeho vypočítaná koncentrace podle rovnice kalibrační přímky

	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr [mAU]	Koncentrace [mg/ml]
Vz 1	228,6	225,1	228,3	227,3	223,3	226,5	0,0140
Vz 2	227,7	230,1	229,0	230,9	230,4	229,6	0,0142
Vz 3	226,1	225,7	224,9	226,6	225,6	225,8	0,0140
Vz 4	225,1	224,9	225,1	224,7	224,9	224,9	0,0139
Vz 5	225,4	224,3	224,8	225,0	225,7	225,0	0,0139
Vz 6	225,6	225,3	225,1	222,2	221,6	224,0	0,0139

RSD plochy pod křivkou = 0,98 %

RSD koncentrace = 0,97 %

### 5.2.2 Přesnost u pyridoxinu

Tabulka č. 10: Hodnoty ploch píků u vzorků pro přesnost pro pyridoxin a jeho vypočítaná koncentrace podle rovnice kalibrační přímky

	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr [mAU]	Koncentrace [mg/ml]
Vz 1	166,8	167,8	167,4	167,1	165,9	167,0	0,0204
Vz 2	167,2	166,8	167,1	166,2	165,9	166,6	0,0204
Vz 3	164,8	166,3	165,2	162,7	163,4	164,5	0,0201
Vz 4	167,7	168,5	169,2	168,5	167,9	168,4	0,0206
Vz 5	167,5	168,8	168,1	166,5	168,1	167,8	0,0205
Vz 6	165,8	166,9	167,1	166,4	165,5	166,3	0,0203

RSD plochy pod křivkou = 0,90 %

RSD koncentrace = 0,90 %

### 5.2.3 Přesnost u nikotinamidu

Tabulka č. 11: Hodnoty ploch píků u vzorků pro přesnost pro nikotinamid a jeho vypočítaná koncentrace podle rovnice kalibrační přímky

	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr [mAU]	Koncentrace [mg/ml]
<b>Vz 1</b>	2081,6	2010,6	2004,3	2021,1	2400,9	<b>2103,7</b>	0,1853
<b>Vz 2</b>	2066,2	2088,2	2081,9	2086,5	2082,5	<b>2081,1</b>	0,1833
<b>Vz 3</b>	2087,2	2091,0	2091,5	2089,8	2086,2	<b>2089,1</b>	0,1840
<b>Vz 4</b>	2050,6	2051,2	2048,3	2048,1	2050,5	<b>2049,7</b>	0,1805
<b>Vz 5</b>	2027,5	2022,7	2027,1	2025,3	2026,7	<b>2025,9</b>	0,1783
<b>Vz 6</b>	2017,8	2023,1	2015,2	2088,1	2085,7	<b>2046,0</b>	0,1801

RSD plochy pod křivkou = 1,61%

RSD koncentrace = 1,65 %

### 5.2.4 Přesnost u kys. askorbové

Tabulka č. 12: Hodnoty ploch píků u vzorků pro přesnost pro kys. askorbovou a její vypočítaná koncentrace podle rovnice kalibrační přímky

	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr [mAU]	Koncentrace [mg/ml]
<b>Vz 1</b>	2987,9	2965,9	2933,9	2893,3	2929,5	<b>2942,1</b>	0,6029
<b>Vz 2</b>	2981,6	2995,3	2968,9	2958,2	2928,3	<b>2966,5</b>	0,6081
<b>Vz 3</b>	2961,5	2940,6	2919,0	2889,1	2858,8	<b>2913,8</b>	0,5969
<b>Vz 4</b>	2943,5	2927,9	2916,1	2895,8	2881,4	<b>2912,9</b>	0,5967
<b>Vz 5</b>	2975,7	2922,7	2927,1	2925,3	2925,3	<b>2935,2</b>	0,6014
<b>Vz 6</b>	3015,4	3011,1	2994,5	2944,5	2928,5	<b>2978,8</b>	0,6108

RSD plochy pod křivkou = 1,03%

RSD koncentrace = 1,07 %

### 5.2.5 Zhodnocení přesnosti

Z vypočítaných hodnot RSD je vidět, že provedení metody je přesné. Hodnoty RSD se pohybují v rozmezí 0,90 až 1,61 % pro plochy pod křivkou a 0,90 až 1,65 % pro koncentrace. To jsou přijatelné hodnoty, které ukazují, že příprava, navažování, mísení, rozpouštění a další kroky přípravy vzorků probíhaly vždy téměř stejně a přesně.

## 5.3 SPRÁVNOST

V tabulkách č. 13-18 jsou výsledky ploch píků jednotlivých vitamínů a jejich vypočítané koncentrace doplněné vypočtenou výtěžností podle vzorce *výtěžnost na str. 19* v teoretické části.

Navažování bylo provedeno na dvojích vahách. Kys. askorbová a nikotinamid byly navažovány na vahách s přesností na tři desetinná místa a pyridoxin a thiamin byly navažovány na vahách s přesností na pět desetinných míst. Proto jsou navážky vitamínů uvedeny s dvojí přesností na desetinná místa.

### 5.3.1 Správnost baňka č. 1

Tabulka č. 13: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2987,5	2982,3	2980,9	<b>2983,6</b>	60,0	61,1774	<b>101,96</b>
Nikotinamid	2137,1	2139,5	2138,7	<b>2138,4</b>	18,3	18,8438	<b>102,97</b>
Pyridoxin	173,9	172,5	171,9	<b>172,8</b>	2,011	2,1078	<b>104,81</b>
Thiamin	229,8	230,1	230,6	<b>230,2</b>	1,438	1,4247	<b>99,08</b>

### 5.3.2 Správnost baňka č. 2

Tabulka č. 14: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2954,7	2958,4	2944	<b>2952,4</b>	60,0	60,5105	<b>100,85</b>
Nikotinamid	2019,8	2105,2	2104,3	<b>2076,4</b>	17,9	18,2875	<b>102,16</b>
Pyridoxin	156,9	174,1	175,5	<b>168,8</b>	2,019	2,0601	<b>102,04</b>
Thiamin	222,9	222,9	222,8	<b>222,9</b>	1,397	1,3800	<b>98,77</b>

### 5.3.3 Správnost baňka č. 3

Tabulka č. 15: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2979,6	2975,3	2977,4	<b>2977,4</b>	60,7	61,0462	<b>100,57</b>
Nikotinamid	2119,8	2124,7	2165,8	<b>2136,8</b>	18,3	18,8290	<b>102,89</b>
Pyridoxin	171,4	171,4	168,9	<b>170,6</b>	1,987	2,0811	<b>104,73</b>
Thiamin	227,5	227,8	232,5	<b>229,3</b>	1,432	1,4192	<b>99,11</b>

### 5.3.4 Správnost baňka č. 4

Tabulka č. 16: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2945,5	2946,3	2944,8	<b>2945,5</b>	59,2	60,3645	<b>101,97</b>
Nikotinamid	2112,7	2116,9	2115,6	<b>2115,1</b>	18,1	18,6342	<b>102,95</b>
Pyridoxin	176,2	179,8	179,7	<b>178,6</b>	2,076	2,1781	<b>104,92</b>
Thiamin	229,2	224,2	224,2	<b>225,9</b>	1,395	1,3983	<b>100,24</b>

### 5.3.5 Správnost baňka č. 5

Tabulka č. 17: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2977,5	2974,3	2970,9	<b>2974,2</b>	60,6	60,9778	<b>100,62</b>
Nikotinamid	2112,9	2111,0	2113,1	<b>2112,3</b>	18,2	18,6096	<b>102,25</b>
Pyridoxin	173,6	172,2	170,5	<b>172,1</b>	2,002	2,0997	<b>104,88</b>
Thiamin	228,9	228,8	229,1	<b>228,9</b>	1,442	1,4172	<b>98,28</b>

### 5.3.6 Správnost baňka č. 6

Tabulka č. 18: Výtěžnost jednotlivých vitamínů pro ověření správnosti

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Průměr [mAU]	Navážka [mg/100 ml]	Zjištěná koncentrace [mg/100 ml]	Výtěžnost [%]
Kys. askorbová	2969,7	2972,6	2970,8	<b>2971,0</b>	59,9	60,9095	<b>101,69</b>
Nikotinamid	2114,5	2116,3	2115,8	<b>2115,5</b>	18,1	18,6383	<b>102,97</b>
Pyridoxin	171,7	172,3	172,7	<b>172,2</b>	2,005	2,1013	<b>104,80</b>
Thiamin	226,3	227,5	225,1	<b>226,3</b>	1,442	1,4010	<b>97,15</b>

### 5.3.7 Zhodnocení správnosti

Vychází-li se z tabulky č. 2, jsou hodnoty výtěžnosti a tedy ukazatel správnosti vyhovující. Hodnoty skutečných navážek a změřených koncentrací se pohybují jen v malých odchylkách. Nejvyšší odchylky jsou patrné u pyridoxinu, nikotinamid má o něco menší odchylky a kyselina askorbová a thiamin mají výtěžnost pohybující se okolo 100%.

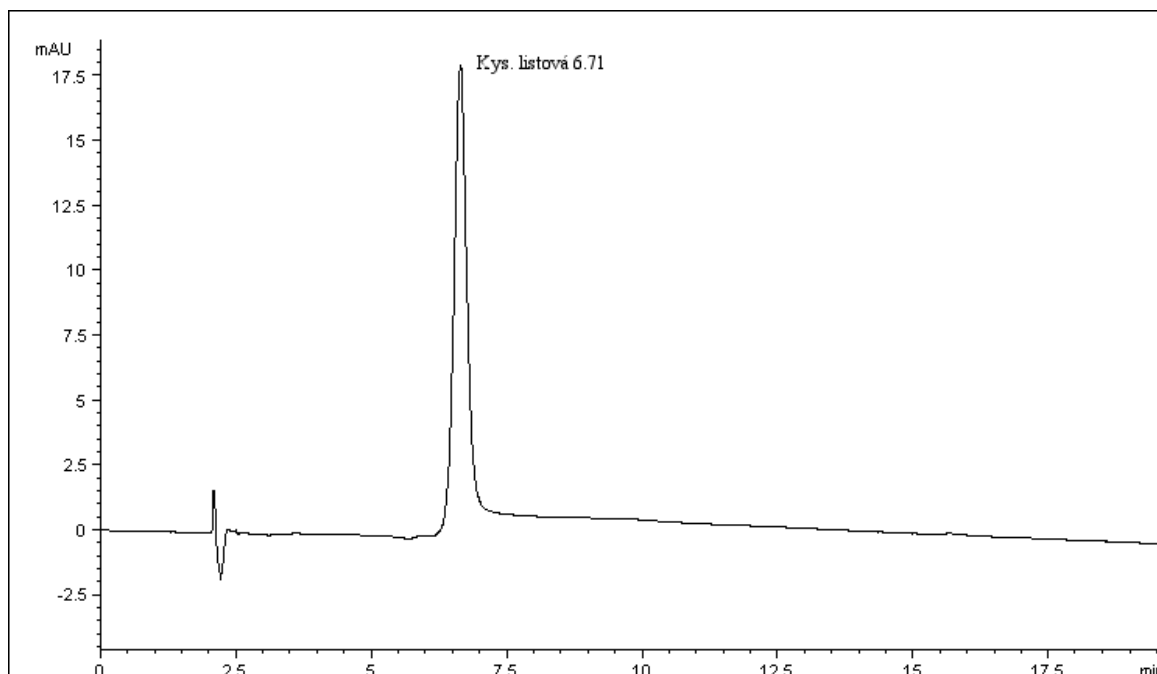
## 5.4 SELEKTIVITA

Z ostatních vitamínů uvedených na obalu šumivého multivitaminového přípravku se eluovaly jen kys. listová, cyanokobalamin a riboflavin. A to v časech 6,71 min, 11,82 min; a 12,97 min. Ostatní nebyly do času 25 min eluovány vůbec. Tím bylo zjištěno, že ostatní vitamíny v přípravku se stanovovanými nijak při analýze neinterferují.

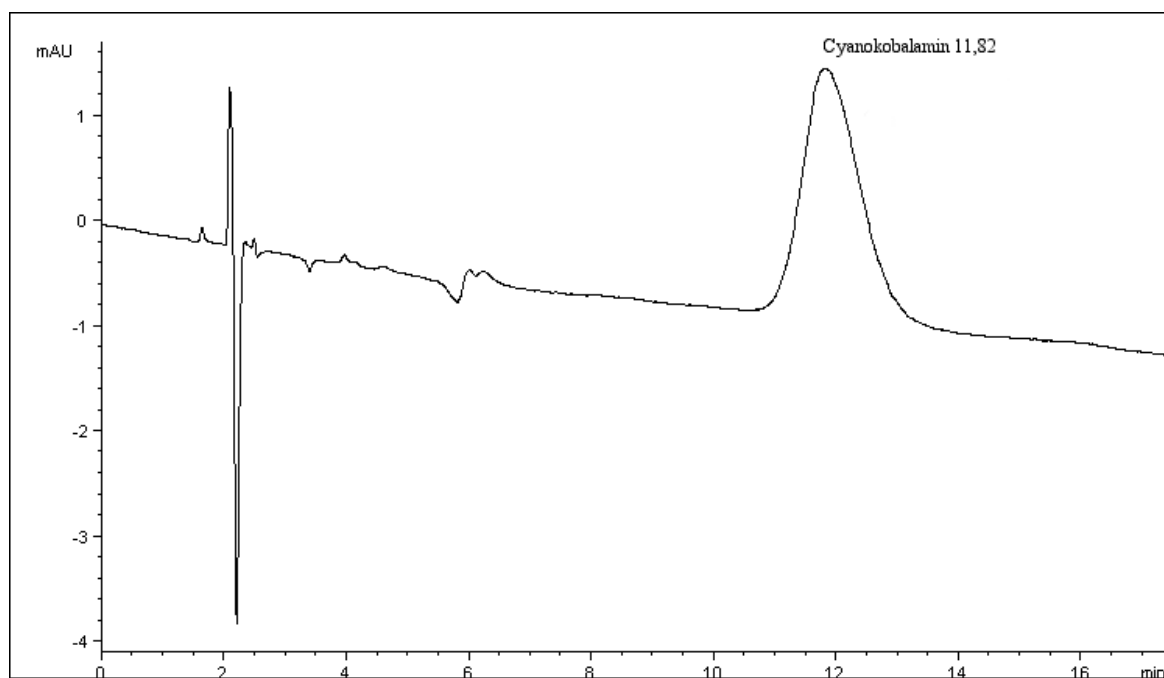
Z pomocných látek se neeluoval pouze aspartam a barvivo E110. Sacharin se eluoval ostrým píkem v čase 2,62 a betakaroten v čase 3,99. Tím bylo potvrzeno, že v místě vymývání pyridoxinu v multivitaminu, jde skutečně o 2 píky. Ten, který se eluuje nepatrně dříve cca v čase 4,0 patří betakarotenu a ten pozdější v čase cca 4,6 patří pyridoxinu.

Na obrázcích č. 7 - 11 jsou uvedeny na ukázkou chromatogramy jednotlivých eluovaných látek.

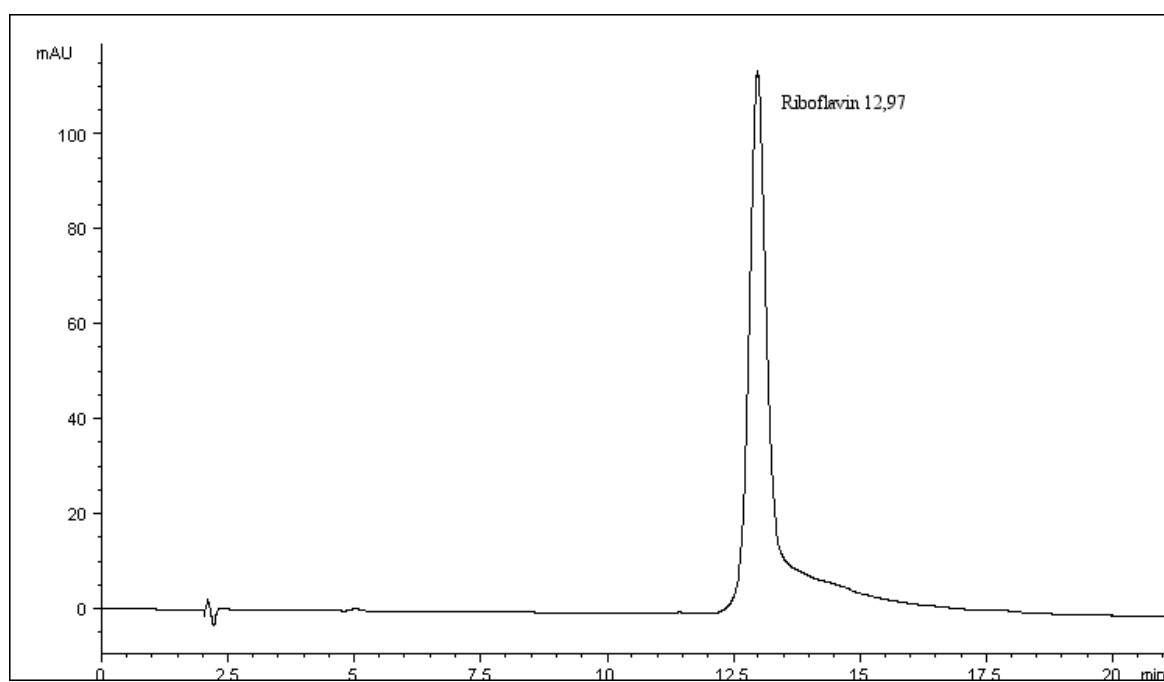
Na obrázku č. 12 je pro porovnání uveden chromatogram multivitaminového přípravku.



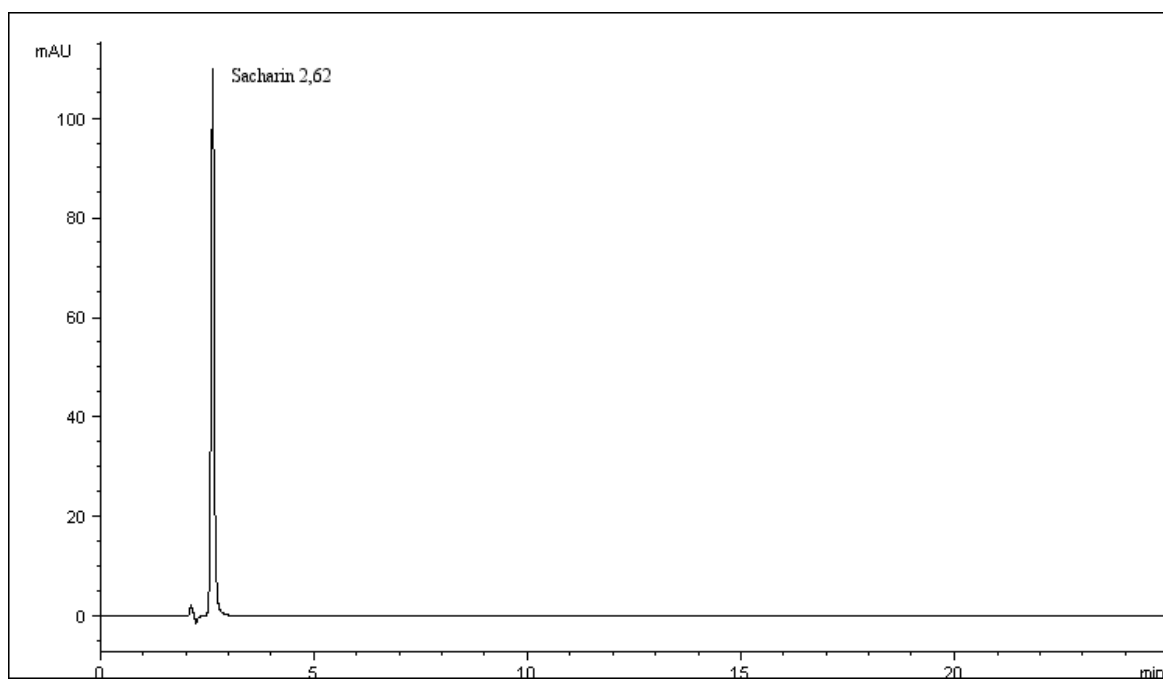
**Obr. č. 7 : Chromatogram kyseliny listové**



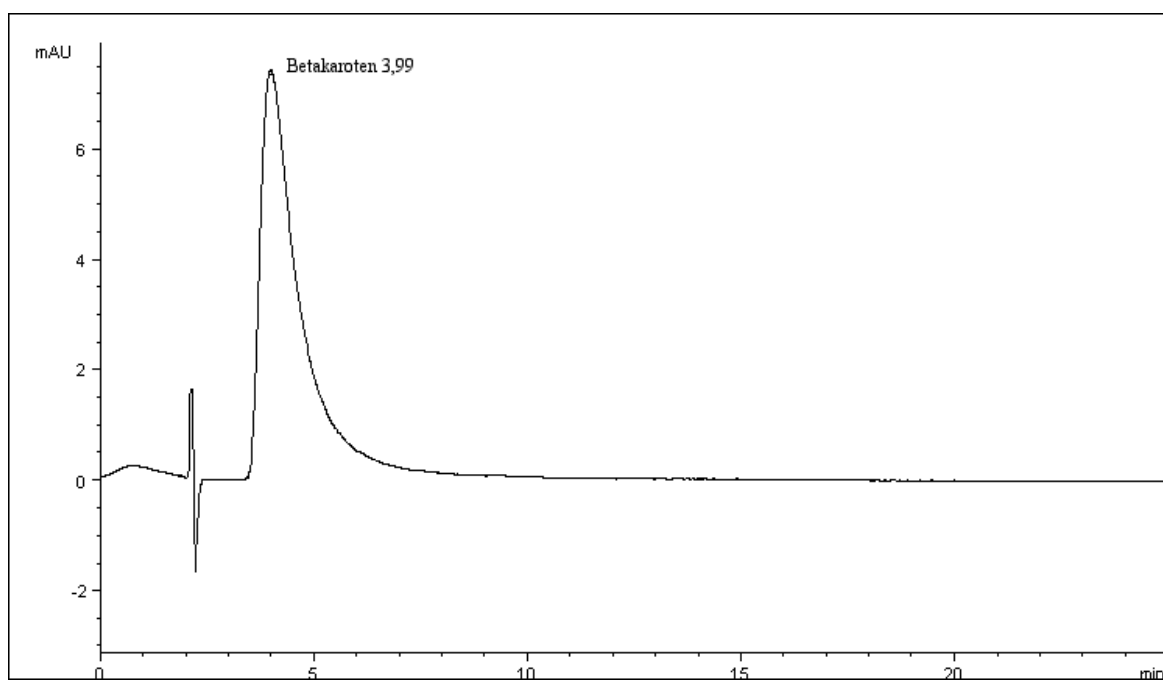
**Obr. č. 8: Chromatogram cyanokobalaminu**



**Obr.č. 9: Chromatogram riboflavinu**

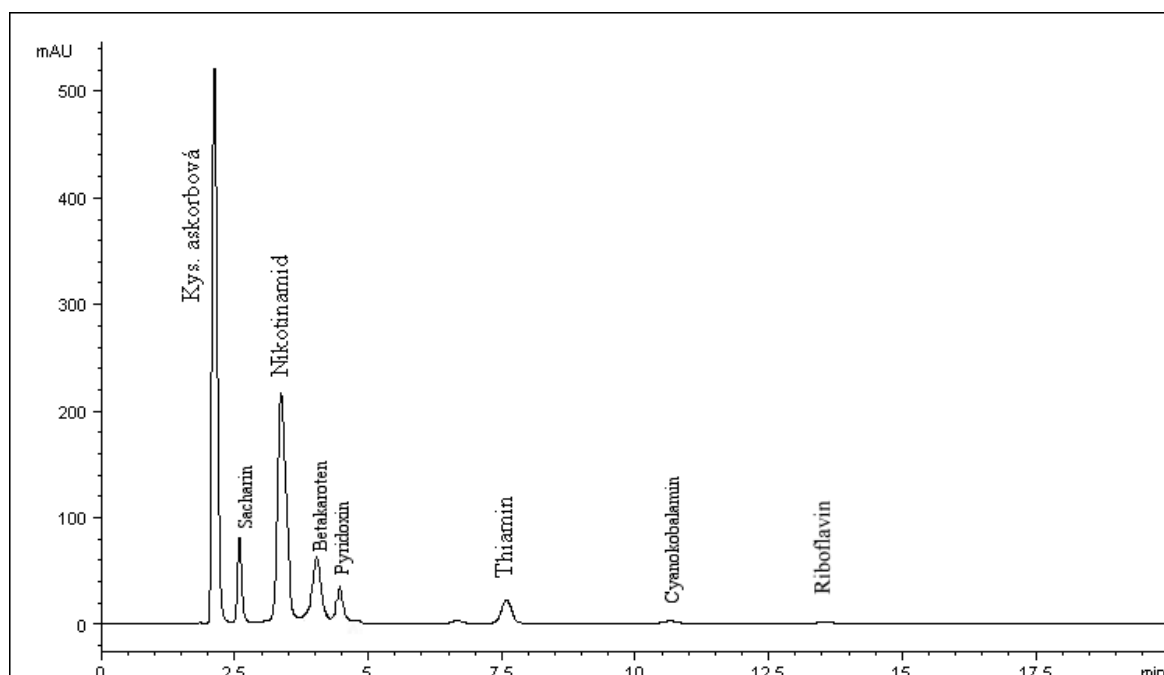


**Obr. č. 10: Chromatogram sacharinu**



**Obr. č. 11: Chromatogram betakarotenu**

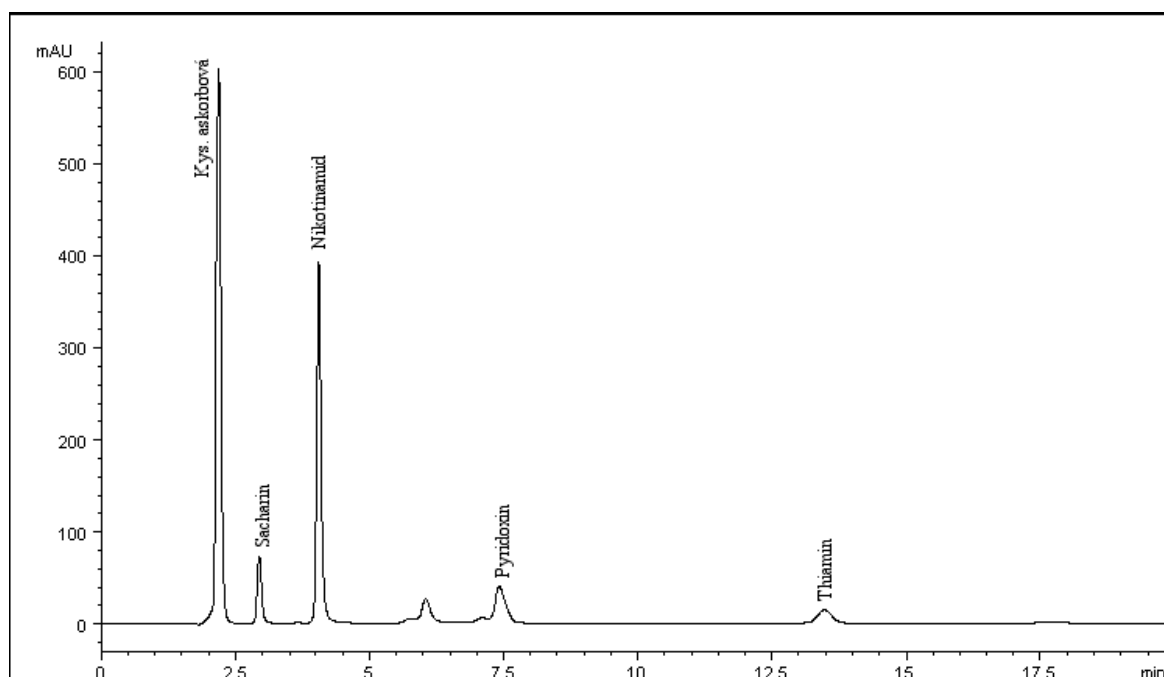




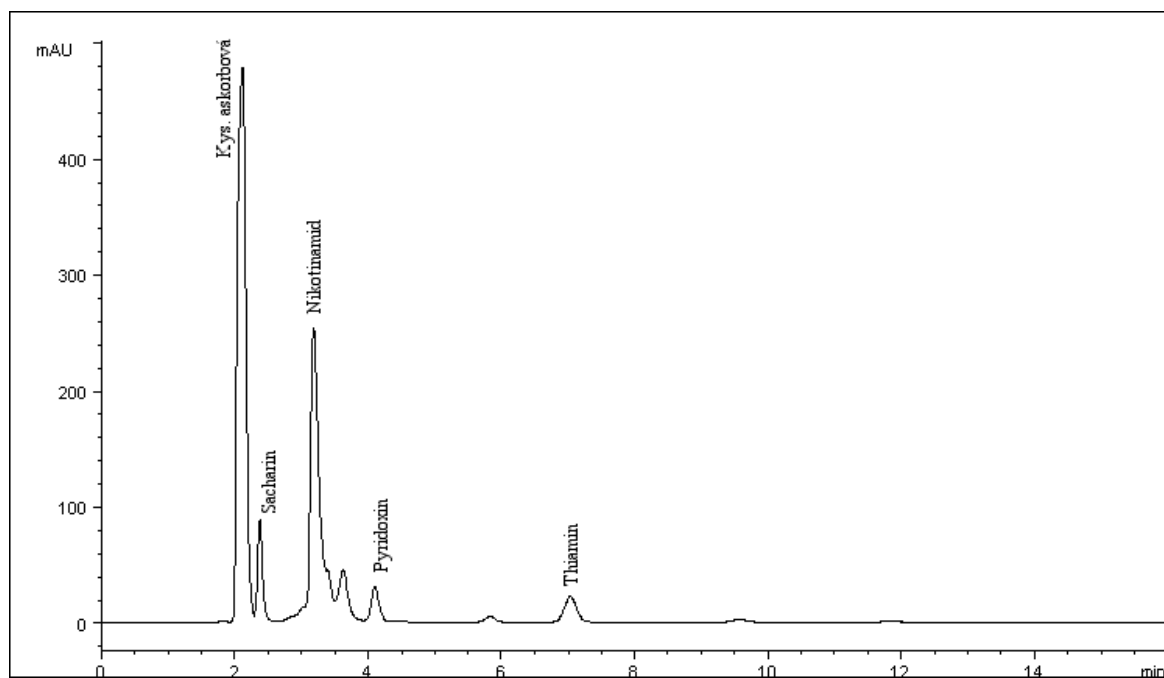
Obr. č. 12: Ukázka chromatogramu multivitaminového přípravku

## 5.5 ROBUSTNOST

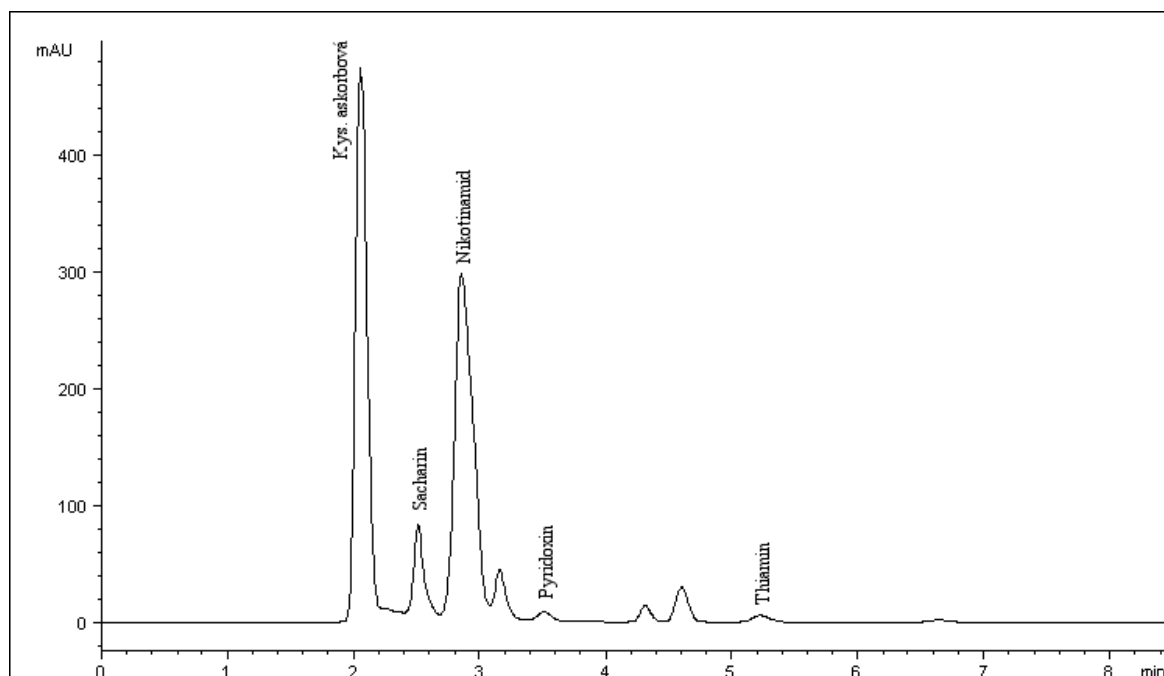
Následující chromatogramy jsou uvedeny pro srovnání změn mobilní fáze a výstupu chromatogramu:



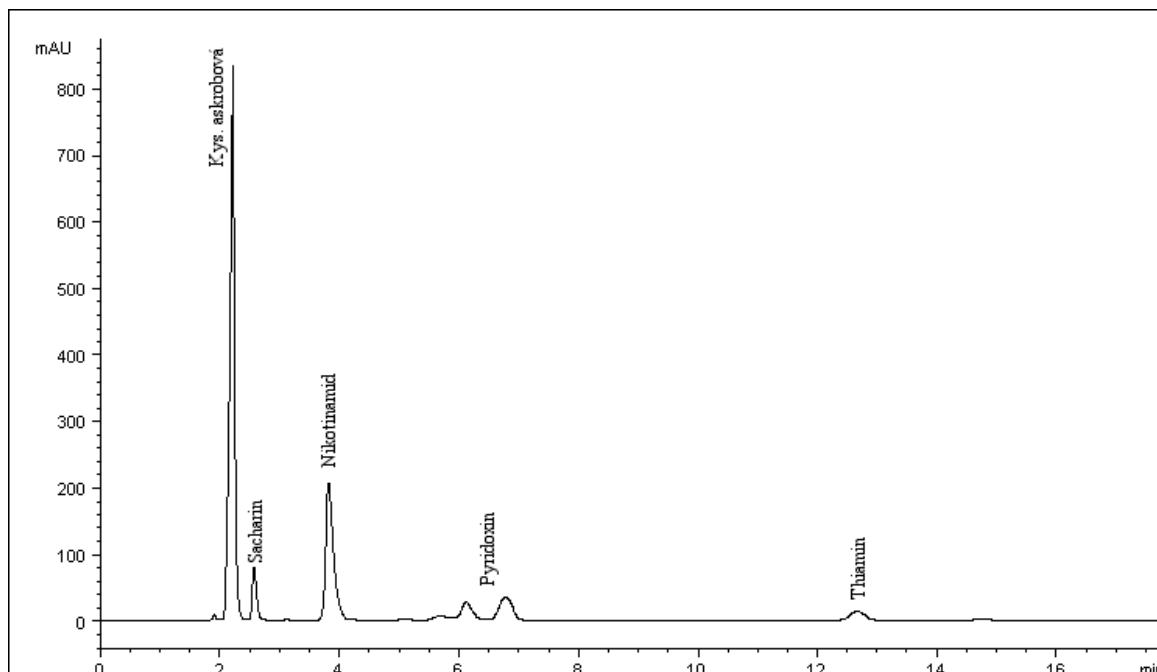
Obr. č. 13: Chromatogram při poměru methanolu a vodné části v mobilní fázi 15:85



**Obr. č. 14: Chromatogram při poměru methanolu a vodné části v mobilní fázi 25:75**



**Obr. č. 15: Chromatogram při změně pH vodné části na 2,3**



**Obr. č. 16: Chromatogram při změně pH vodné části na 3,3**

### 5.5.1 Zhodnocení robustnosti

Z ukázek chromatogramů je vidět, že snížením podílu methanolu a zvýšením podílu vodné fáze oddělí více jednotlivé píky a prodlouží dobu analýzy. Opačná situace pak píky vzájemně více přiblíží, doba analýzy je pak okolo deseti minut.

Při snížení pH vodné fáze dochází k rozšíření píků a zároveň k vzájemnému přiblížení jednotlivých píků. Při zvýšení pH se píky opět zužují a mírně vzájemně vzdalují.

## 5.6 NÁVRH TESTU ZPŮSOBISLOSTI

### Test způsobilosti, porovnávací roztok (3):

- rozlišení: nejméně 1,5 mezi píkem kyseliny askorbové a píkem sacharinu, nejméně 2,0 mezi píkem nikotinamidu a píkem betakarotenu a nejméně 1,5 mezi píkem betakarotenu a píkem pyridoxinu

Vzorec pro výpočet viz strana č. 23

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo validovat metodu rozpracovanou v diplomové práci (35) a navrhnout test způsobilosti. Z validačních parametrů byla provedena linearita, přesnost, správnost, selektivita a robustnost.

Linearita byla ověřena již v diplomové práci, v této práci byla provedena rozdílnou metodou – ředěním zásobních roztoků standardů vitamínů, která se ukázala být vhodnější, díky své nižší náročnosti a vyšší přesnosti.

Přesnost byla provedena jako opakovatelnost. Byl šestkrát připraven roztok multivitaminového přípravku a těchto šest roztoků bylo analyzováno. Byla vypočítána relativní směrodatná odchylka, která se pohybovala v rozmezí 0,9% - 1,61%, což je vyhovující.

Správnost byla provedena pomocí připraveného placeba a přidáním přesných navážek standardů vitamínů. Výsledky analýzy byly pak srovnávány se skutečnými navážkami standardů formou výpočtu výtěžnosti, která se pohybovala v rozmezí 97,15 – 104,92%.

Selektivita byla provedena pro určení, zda se některé píky například pomocných látek nebo ostatních vitamínů nemohou krýt se stanovovanými vitamíny. Bylo zjištěno, že pouze betakaroten se eluuje v těsné blízkosti pyridoxinu. Ostatní látky se eluují v jiných časech, nebo se neeluují vůbec.

Robustnost byla provedena celkem čtyřmi změnami mobilní fáze (změnami pH a změnami poměru methanolu a vodné fáze). Bylo zjištěno, že i těmito změnami dochází ke změnám poloh jednotlivých píků a jejich tvarům, proto je nutné dodržovat složení mobilní fáze při dalších analýzách.

Součástí práce je i návrh testu způsobilosti chromatografického systému, který zahrnuje stanovení rozlišení.

## 7 LITERATURA

---

- (1) F. Renger, J. Kalous, Analytická chemie I., Univerzita Pardubice, Pardubice 1998
- (2) F. Vlášil, Úvod do dělicích metod. In: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- (3) J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006
- (4) Z. Holzbecher, J. Churáček, Analytická chemie, Nakladatelství technické literatury, Praha 1987
- (5) R. Komers, M. Krejčí, Plynová chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- (6) J. Gasparič, J. Churáček, Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
- (7) O. Motl, L. Novotný, Chromatografie na tenké vrstvě. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- (8) O. Mikeš, Základní typy chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- (9) A. V. Kiselev, J. I. Jašin, Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie, Nakladatelství technické literatury, Praha 1988
- (10) O. Motl, L. Novotný, Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie, In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980

- 
- (11) M. Hejtmánek, Kapalinová chromatografie. In: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- (12) V. Tomášek, Gelová chromatografie. In.: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- (13) J. Turková, Afinitní chromatografie. In: Mikeš O. a kol: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- (14) J. Novák, Principles and theory of chromatography. In: Z. Deyl, Separation methods, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984
- (15) J. Churáček, P. Jandera, Separace látek , Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie, Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1986
- (16) R. Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- (17) J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2007
- (18) Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada, Praha 2009
- (19) J. Churáček a kol., Analytická separace látek, Nakladatelství technické literatury, Praha 1990
- (20) B. Meloun, Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- (21) J. Klíma, J. Graffnetterová, Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
- (22) P. Klouda, Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003

- 
- (23) P. Jandera, Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC – současný stav a perspektivy, Vitamin 2003, Pardubice, Česká republika
- (24) E. Cuřínová, B. Kafková, Z. Bosáková, E. Tesařová,  
<http://katedry.fmfi.vsb.cz/615/cenaMERCK/abstrakty/04%20Curinova.pdf>
- (25) F. Švec, Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií, Chem. listy 103, 266-270, 2009
- (26) J. Churáček, P. Jandera, Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, SNTL, Praha 1984
- (27) V. Ostrovská Validace analytických metod. In: P.Beňo a kol., Stabilita liečiv a liekov, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, 2003
- (28) L. Huber : Validation and qualification in analytical laboratories, Buffalo Grove, Illinois, USA: Interpharm press, Inc., 1999,127-131
- (29) M. Douša, [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz), poslední revize 2. března 2010
- (30) S. Silbernagl, Atlas fyziologie člověka, Grada, Praha 2004
- (31) N. Gaier, Vitaminy a látky užívané lokálně In: D. Lincová, H. Farghali a kol., Základní a aplikovaná farmakologie, Grada, Praha 2007
- (32) M. Ledvina, A. Stoklasová, J. Cerman, Biochemie pro studující medicíny II.díl, Karolinum, Praha 2006
- (33) L. Ducháček, J. Lamka, Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2006
- (34) J. Lamka, L. Ducháček, Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2006

---

(35) K. Boudová, Diplomová práce – Analytické hodnocení léčiv s využitím chromatografických metod VI., 2009